



Tesis Doctoral

DESARROLLO DE BIOMATERIALES BASADOS EN ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES POROSAS

Memoria para optar al grado de
DOCTOR EN QUÍMICA

Stefania Nardecchia

Directores:

Dra. Maria Luisa Ferrer Pla
Dra. María C. Gutiérrez Pérez

Grupo de Materiales Bioinspirados (ICMM-CSIC)
Departamento de Química Inorgánica (UAM)
Madrid, 2012

*A Ma&Pa, Fra, Giu
e Ciuffo*

*Quando è ricco di presenze e di avventure il tempo ti fugge dalle dita, un attimo incalza l'altro e lo spinge indietro
nel passato mentre l'attimo futuro ti piomba addosso con la velocità della luce.*

*Ma quando lo rivisiti nel ricordo quel periodo della tua Vita ti sembrerà infinitamente lungo,
a misura dei fatti e degli incontri che l'hanno costellato. Incessante romba il tempo e incanutiscono i covoni della
tua Vita e non sai se sia lui a trasportarti o tu a condurlo verso la foce.*

Eugenio Scalfari - L'uomo che non credeva in Dio

...água mole em pedra dura tanto bate até que fura...

Credo di sapere oggi, guardando indietro, che una delle mie forze è sempre stata quella di prepararmi bene prima di realizzare i miei sogni, prima di prendermi delle libertà con la Vita.

Björn Larsson - Bisogno di libertà



Tesis Doctoral

DESARROLLO DE BIOMATERIALES BASADOS EN ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES POROSAS

Memoria para optar al grado de
DOCTOR EN QUÍMICA

Stefania Nardecchia

Directores:

Dra. Maria Luisa Ferrer Pla
Dra. María C. Gutiérrez Pérez

Grupo de Materiales Bioinspirados (ICMM-CSIC)

Departamento de Química Inorganica (UAM)

Madrid, 2012

ÍNDICE

I - INTRODUCCIÓN	1
1.1. BIOMATERIALES	3
1.1.1. BIOMATERIALES PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS	6
1.1.2. SOPORTES TRIDIMENSIONALES POROSOS: <i>SCAFFOLDS</i>	8
1.1.2.1. Estructura jerárquica de los soportes tridimensionales	9
1.1.2.2. Propiedades de un biomaterial para Ingeniería de tejidos	12
1.1.2.3. Materiales para la preparación de <i>scaffolds</i>	13
1.1.2.4. Métodos de procesamiento de soportes poliméricos	15
1.1.2.5. Aplicación de <i>scaffolds</i> en Ingeniería de tejidos: estado del arte	16
1.2. PROCESO CRIOGÉNICO: METODOLOGÍA ISISA	19
1.2.1. ORIGEN DE LOS CRIOGELES	19
1.2.2. CONTROL DE LA MORFOLOGÍA EN EL PROCESO ISISA	21
1.2.2.1. Influencia de la concentración y naturaleza de los materiales	24
1.2.2.2. Influencia de la velocidad de inmersión	25
1.2.2.3. Influencia de la temperatura de congelación	26
1.2.3. APLICACIONES Y VERSATILIDAD DE LA METODOLOGÍA ISISA	27
1.3. BIBLIOGRAFÍA	31
II - OBJETIVOS	39
III - METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	43
3.1. PRINCIPALES MATERIALES EMPLEADOS	45
3.1.1. MATERIALES PARA LA FABRICACIÓN DEL SOPORTE	45
3.1.1.1. Nanotubos de carbono	45
3.1.1.2. Polisacáridos	46
3.1.1.2.1. <i>Quitosano</i>	46
3.1.1.2.2. <i>Sulfato de condroitina</i>	47
3.1.1.2.3. <i>Ácido hialurónico</i>	48
3.1.1.3. Proteínas	49
3.1.1.3.1. <i>Gelatina</i>	49
3.1.1.3.2. <i>Polímeros sintéticos tipo “elastina”</i>	50
3.1.2. COMPONENTES PARA ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	52
3.1.2.1. Fármaco: Ciprofloxacino	52
3.1.2.2. Proteína morfogenética ósea: rhBMP-2	53
3.2. MÉTODOS	54
3.2.1. ESTRUCTURAS 3D DE QUITOSANO CON CFX Y rhBMP-2	54
3.2.1.1. Modificación y caracterización del quitosano	54
3.2.1.1.1. <i>Degradación del quitosano</i>	54
3.2.1.1.2. <i>Determinación del peso molecular medio</i>	54
3.2.1.1.3. <i>Determinación del contenido en cenizas</i>	55
3.2.1.1.4. <i>Determinación del grado de humedad</i>	55
3.2.1.1.5. <i>Análisis térmogravimétrico</i>	56
3.2.1.1.6. <i>Determinación de la viscosidad estática de las disoluciones de quitosano</i>	56

3.2.1.2. Doble liofilización de CFX	56
3.2.1.3. Estudio de la precipitación de fosfato de calcio y CFX en disolución acuosa	56
3.2.1.3.1. <i>Medidas de pH de disoluciones acuosas contenente fosfato de calcio y/o CFX</i>	57
3.2.1.3.2. <i>Caracterización del fosfato de calcio y del CFX</i>	57
3.2.1.4. Preparación de los <i>scaffolds</i> de quitosano	58
3.2.1.4.1. <i>Preparación asistida por ureasa de los scaffolds de quitosano con y sin CFX</i>	58
3.2.1.4.2. <i>Preparación asistida por ureasa de los scaffolds de quitosano-ACP con y sin CFX</i>	59
3.2.1.4.3. <i>Preparación asistida por ureasa de los scaffolds de quitosano-ACP con y sin rhBMP-2</i>	59
3.2.1.4.4. <i>Nomenclatura scaffolds de quitosano con CFX o rhBMP-2</i>	60
3.2.1.5. Caracterización de los <i>scaffolds</i> para liberación controlada	61
3.2.1.5.1. <i>Caracterización morfológica de los scaffolds de quitosano</i>	61
3.2.1.5.2. <i>Caracterización del fosfato de calcio y del CFX en los scaffolds de quitosano</i>	61
3.2.1.5.3. <i>Determinación del tiempo de gelificación del quitosano</i>	62
3.2.1.5.4. <i>Determinación del grado de hinchamiento</i>	62
3.2.1.5.5. <i>Determinación de la resistencia a la tensión de los scaffolds</i>	62
3.2.1.6. Estudios de liberación controlada	63
3.2.1.6.1. <i>Estudios de liberación controlada de CFX</i>	63
3.2.1.6.2. <i>Ensayo de liberación de rhBMP-2</i>	64
3.2.1.7. Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	64
3.2.1.7.1. <i>Ensayos de proliferación in vitro</i>	64
3.2.1.7.2. <i>Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)</i>	65
3.2.1.7.3. <i>Estudio preliminar del modelo experimental in vivo</i>	66
3.2.2. ESTRUCTURAS 3D DE NANOTUBOS DE CARBONO	66
3.2.2.1. Modificación y caracterización de los MWCNTs	66
3.2.2.1.1. <i>Purificación de los MWCNTs</i>	66
3.2.2.1.2. <i>MWCNTs funcionalizados en medio ácido (NHTS)</i>	66
3.2.2.1.3. <i>Caracterización de los CNTs</i>	67
3.2.2.2. Purificación de la gelatina	67
3.2.2.3. Preparación de los <i>scaffolds</i> de CNTs	67
3.2.2.3.1. <i>Preparación de suspensiones acuosas de CNTs</i>	67
3.2.2.3.2. <i>Procesado ISISA de la dispersiones de CNTs</i>	68
3.2.2.3.3. <i>Entrecruzamiento de las matrices</i>	68
3.2.2.4. Nomenclatura de los <i>scaffolds</i> con CNTs	69
3.2.2.5. Caracterización de los <i>scaffolds</i> de CNTs	70
3.2.2.5.1. <i>Caracterización morfológica de los scaffolds de CNTs</i>	70
3.2.2.5.2. <i>Medidas de conductividad</i>	70
3.2.2.5.3. <i>Medidas mecánicas: pruebas de flexión</i>	71
3.2.2.5.4. <i>Análisis térmogravimétrico</i>	71
3.2.2.6. Ensayos de biocompatibilidad <i>in vitro</i>	71
3.2.2.6.1. <i>Células y medios de cultivo</i>	71
3.2.2.6.2. <i>Cultivo celular en condiciones estáticas</i>	72
3.2.2.6.3. <i>Cultivo celular e condiciones de flujo</i>	72
3.2.2.6.4. <i>Estudios de adhesión y morfología celular</i>	72

3.2.2.6.5. Ensayos de viabilidad celular	73
3.2.2.6.6. Estudios de apoptosis	73
3.2.2.6.7. Estadística	74
3.2.3. ELECTRODEPOSICIÓN EN FLUJO DE FOSFATO DE CALCIO SOBRE SCAFFOLDS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y QUITOSANO	74
3.2.3.1. Preparación del cátodo y montaje de la celda electrolítica	74
3.2.3.2. Electrodeposición en flujo de fosfato de calcio sobre scaffolds	76
3.2.3.3. Caracterización del sistema electrodepositado	76
3.2.3.4. Ensayos de biocompatibilidad <i>in vitro</i>	76
3.2.3.4.1. Estudios generales de biocompatibilidad: adhesión, morfología y viabilidad	76
3.2.3.4.2. Estudios de diferenciación en osteoblastos	76
3.2.3.4.2.1. Actividad de fosfatasa alcalina (ALP)	77
3.2.3.4.2.2. Formación de depósitos de calcio	77
3.2.3.4.3. Estadística	78
3.3. BIBLIOGRAFÍA	79
IV - SCAFFOLDS DE QUITOSANO MINERALIZADOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO	85
4.1. INTRODUCCIÓN	87
4.1.1. BIOMATERIALES COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	87
4.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	89
4.1.3. SCAFFOLDS DE QUITOSANO MINERALIZADOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE CFX	92
4.2. ESTUDIO DE SOLUBILIDAD DE LOS CRISTALES DE CFX	94
4.3. ESTUDIOS DE PRECIPITACIÓN DE FOSFATO DE CALCIO Y CFX EN DISOLUCIÓN SIN QUITOSANO	95
4.3.1. PRECIPITACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL FOSFATO DE CALCIO	96
4.3.2. PRECIPITACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ACP-CFX	98
4.4. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL HIDROGEL	101
4.5. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS	106
4.5.1. MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LAS MATRICES	107
4.5.2. PROPIEDADES MECANICAS	112
4.5.3. PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO	113
4.5.4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE CFX	114
4.6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	119
4.7. BIBLIOGRAFÍA	120
V- SCAFFOLDS DE QUITOSANO COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE BMP-2 PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO	125
5.1. INTRODUCCIÓN	127

5.1.1. IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA BMP-2	127
5.1.2. SOPORTES PARA INJERTOS ÓSEOS	128
5.1.3. <i>SCAFFOLDS</i> COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS	129
5.1.4. <i>SCAFFOLDS</i> DE QUITOSANO CON LA PROTEÍNA BMP-2	131
5.2. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO	131
5.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS <i>SCAFFOLDS</i>	133
5.3.1. MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LAS MATRICES	134
5.3.2. PROPIEDADES MECANICAS	136
5.3.3. PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO	138
5.4. ESTUDIO DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE BMP-2	139
5.5. ESTUDIOS PRELIMINARES DE BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> Y <i>IN VIVO</i>	141
5.5.1. ESTUDIO DE ADHESIÓN CELULAR	141
5.5.2. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	141
5.5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA	144
5.5.4. ESTUDIOS PRELIMINARES <i>IN VIVO</i>	145
5.6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	148
5.7. BIBLIOGRAFÍA	149
 VI- ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE SULFATO DE CONDROITINA Y NANOTUBOS DE CARBONO	 153
6.1. INTRODUCCIÓN	155
6.1.1. SOPORTES DE CNTs	155
6.1.2. SOPORTES 3D DE CNTs MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA	156
6.2. TRATAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CNTs	157
6.3. PREPARACIÓN DE LOS <i>SCAFFOLDS</i> DE CNTs MEDIANTE ISISA	160
6.3.1. LA VELOCIDAD DE CONGELADO	160
6.3.2. LA CONCENTRACIÓN DE SOLUTO Y DE CNTs	163
6.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS <i>SCAFFOLDS</i> DE CNTs	168
6.4.1. ENTRECRUZAMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE LOS <i>SCAFFOLDS</i>	169
6.4.2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HINCHAMIENTO	170
6.4.3. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO	172
6.4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD	174
6.4.5. ENSAYOS DE FLEXIÓN A TRES PUNTOS	178
6.5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	181
6.6. BIBLIOGRAFÍA	182

VII- SCAFFOLDS DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS	185
7.1. INTRODUCCIÓN	187
7.1.1. BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS CNTs	187
7.1.2. SOPORTES DE CNTs EN INGENIERÍA DE TEJIDOS: ESTADO DEL ARTE	189
7.1.2.1. Soportes de CNTs para la regeneración de tejido óseo	189
7.1.2.2. Soportes de CNTs para la regeneración de tejido nervioso	190
7.1.3. SOPORTES 3D DE CNTs MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA	191
7.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>SCAFFOLDS</i> DE CNTs	192
7.2.1. PREPARACIÓN DE <i>SCAFFOLDS</i> MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA	191
7.2.2. REFORZAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS <i>SCAFFOLDS</i>	197
7.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS <i>SCAFFOLDS</i>	199
7.2.3.1. Análisis termogravimétrico	200
7.2.3.2. Pruebas mecánicas: ensayos de flexión en tres puntos	201
7.2.3.3. Determinación de la conductividad	204
7.3. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD IN VITRO	205
7.3.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	207
7.3.2. ESTUDIOS DE ADHESIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR	213
7.3.3. ENSAYOS DE APOPTOSIS	215
7.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES	217
7.5 BIBLIOGRAFÍA	218
 VIII- ESTUDIOS PRELIMINARES DE COLONIZACIÓN EN FLUJO CON <i>SCAFFOLDS</i> DE NANOTUBOS DE CARBONO	 223
8.1. INTRODUCCIÓN	225
8.1.1. LIMITACIONES EN LA COLONIZACIÓN DE <i>SCAFFOLDS</i> 3D	225
8.1.2. IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DE POROS EN LOS <i>SCAFFOLDS</i>	227
8.1.3. SOPORTES 3D DE CNTs MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA	228
8.2. ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE CONTROL EN ISISA	229
8.2.1. LA TEMPERATURA DE CONGELADO	229
8.2.2. LA VELOCIDAD DE CONGELADO	231
8.2.3. LA CONCENTRACIÓN DEL DISPERSANTE Y EL TIPO DE CNTs	233
8.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS <i>SCAFFOLDS</i> DE CNTs	235
8.4. ESTUDIOS IN VITRO DE COLONIZACIÓN DE LOS <i>SCAFFOLDS</i>	236
8.4.1. ESTUDIOS ESTÁTICOS: MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD	237
8.4.2. ESTUDIOS PRELIMINARES EN FLUJO: MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD	238
8.5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	240
8.6. BIBLIOGRAFÍA	241

IX- ELECTRODEPOSICIÓN EN FLUJO DE FOSFATO DE CALCIO SOBRE SOPORTES DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO	245
9.1. INTRODUCCIÓN	247
9.1.1. EL TEJIDO ÓSEO	247
9.1.2. SOPORTES PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO	248
9.1.3. BIOMINERALIZACIÓN DE SOPORTES POROSOS	249
9.1.4. MINERALIZACIÓN MEDIANTE ELECTRODEPOSICIÓN	250
9.1.5. SOPORTES 3D DE CNTs BIOMINERALIZADOS	251
9.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS	252
9.3. MINERALIZACIÓN MEDIANTE ELECTRODEPOSICIÓN	257
9.3.1. PREPARACIÓN DEL ELECTRODO 3D	257
9.3.2. MINERALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS	258
9.4. ESTUDIOS CELULARES	267
9.4.1. ESTUDIOS DE BICOMPATIBILIDAD GENERAL	267
9.4.2. ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS	270
9.5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	273
9.6. BIBLIOGRAFÍA	274
 X- CONCLUSIONES	 283

I. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOMATERIALES

Durante siglos, cuando un tejido u órgano humano sufría una dolencia o enfermedad grave, la alternativa más frecuente era su extirpación o su amputación. Aunque la utilización de algunos materiales para ciertas aplicaciones se remonta a los tratados médicos más remotos, existiendo ya descripción detallada de algunas aplicaciones en la medicina oriental hace más de 2500 años, la Ciencia de los Biomateriales no se desarrolla rigurosamente hasta bien entrado el siglo XX, como respuesta a los desastres asociados a las grandes guerras mundiales. El desarrollo de esta ciencia interdisciplinar ha ido produciéndose de forma paralela al de materiales avanzados, diseñados inicialmente para aplicaciones que tenían poca relación con el organismo humano, pero que han supuesto la base del desarrollo de técnicas, metodologías y dispositivos de muy variada naturaleza, diseño y morfología. En 1987 se estableció una primera definición de biomaterial, como aquel material inerte usado como dispositivo médico y desarrollado para interactuar con sistemas biológicos.¹ En el año 1991, se propone una definición más amplia que considera biomaterial “cualquier material diseñado para actuar en la interfase con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo”.² Genéricamente se plantearon dos alternativas ([Fig. 1.1](#)) que han ido progresando con el paso del tiempo mediante la adecuada selección de materiales y metodologías, así como a los importantes avances en las técnicas de anestesia, esterilización y intervenciones quirúrgicas, y al desarrollo de nuevos medicamentos: los Implantes y los Trasplantes. Ambas alternativas presentan sus ventajas y sus limitaciones, pero su desarrollo ha sido espectacular. Los trasplantes se consideran la solución más idónea en el caso de órganos vitales (como riñón, hígado, pulmón y corazón), pero todavía resulta muy limitada en el caso de buena parte de las afecciones traumatológicas (articulaciones, ligamentos, tendones), así como en cirugía vascular o en los procesos de regeneración epitelial en grandes quemados. Por este motivo, en los últimos años se han ido desarrollando nuevos implantes que, basados en materiales muy diversos, pueden suplir al tejido u órgano original.

La ventaja más sobresaliente de los biomateriales como implantes, prótesis o dispositivos implantables, es su disponibilidad, reproducibilidad y adaptación biomecánica. Su desarrollo, producción y aplicación se regula a nivel internacional mediante reglas de control muy estrictas (principalmente establecidas por la FDA, *Food and Drug Administration*). En la [tabla 1.1](#) se recogen diferentes aplicaciones de los biomateriales en especialidades médicas y quirúrgicas bien establecidas desde hace muchos años.

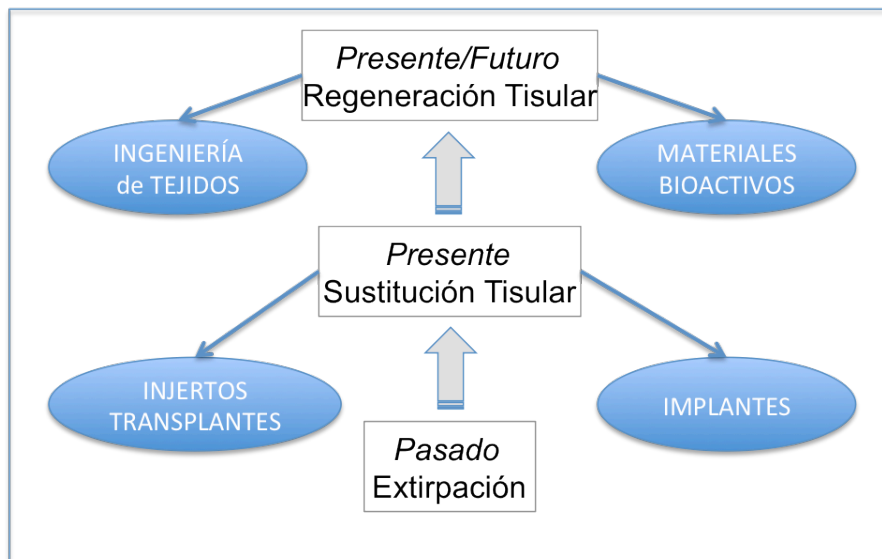


Figura 1.1. Desarrollo histórico de la aplicación de los biomateriales y expectativas de futuro.³

Un aspecto importante y complementario a la definición de biomaterial es la respuesta del organismo cuando se introduce un cuerpo exógeno en él. Tanto los componentes que constituyen el biomaterial, como los productos, que se generen en procesos biodegradativos que puedan sufrir, deben de ser biocompatibles. La biocompatibilidad se define como la capacidad de un determinado material para dar una respuesta apropiada en una aplicación específica. El concepto de biocompatibilidad es, por tanto, condición necesaria pero no suficiente para considerar un biomaterial. La implantación de cualquier tipo de material (o la aplicación de una determinada solución o dispersión inyectables) origina una respuesta del organismo que no solo depende de la composición del biomaterial, sino de factores tan específicos como la forma, el tamaño, la geometría o las propiedades características superficiales, con respecto a los materiales. Además, también depende de las reacciones que se manifiestan en el organismo receptor. Así que resulta muy complicado poder considerar unos criterios subjetivos que definan y establezcan claramente los parámetros de biocompatibilidad.

La presencia de los biomateriales en nuestra sociedad es cada día mayor y son ya muy numerosos los campos de aplicación que hoy en día tienen (los utilizan). Destacan por su relevancia la cirugía y la nanomedicina, los métodos de diagnósticos, los sistemas de liberación de fármacos y la Ingeniería de tejidos. Es precisamente en estos últimos dos campos de aplicación donde se engloba el trabajo que se describe en esta memoria.

Tabla 1.1. Aplicaciones de los biomateriales en diferentes especialidades médico/quirúrgicas.³

Área médica	Aplicación
Aplicaciones Dentales/ Cirugía Maxilofacial	Implantes dentales integrados; Sistemas barrera; Membranas; Sistemas de liberación controlada de medicamentos.
Otorrinolaringología	Prótesis de oído; Implantes cocleares; Biosensores; Tráquea biológica.
Cardiovascular	Prótesis vasculares; marcapasos; Válvulas; Desfibriladores implantables; Dispositivos de asistencia cardíaca; Catéteres; Injertos vasculares; Bombas osmóticas; Stents coronarios; Stents con recubrimiento antitrombogénico y antiproliferativo; Sistemas de dosificación de medicamentos.
Cirugía Plástica	Implantes de mama y otros materiales de relleno; Inyectables.
Sistemas de Liberación Controlada	Implantes; Inyectables; Profilácticos; Transdérmicos
Cirugía General	Sistemas barrera; Catéteres; Stents; Drenajes; Endoscopia; Electrodo; Tubos de drenaje; Respiradores; Suturas; Matrices de injerto; Agentes hemostáticos; Implantes terapéuticos; Mallas soporte; Bioadhesivos; Aislantes; Membranas.
Sistema Genitourinario	Stents; Controladores de incontinencia; Implante de vejiga; Válvulas; Catéteres.
Oftalmología	Prótesis oculares; Lentes Intraoculares; Cornea artificial; Lentes de contacto; Catéteres de drenaje; Sistemas de dosificación controlada; Geles intraoculares (humor vítreo); Sistemas de hidratación (ojo seco).
Cirugía Ortopédica	Prótesis de articulaciones (cadera, rodilla, hombro, etc); Dispositivos de fijación (clavos, tornillos, agujas, placas); Injertos óseos; Matrices de injerto; Cementos óseos; Lubrificantes; Sistemas de relleno óseo; Bioadhesivos; Sistemas de dosificación controlada; Sistemas de sutura; Fijadores externos.
Radiología/Braquiterapia	Soluciones de contraste para diagnóstico; Implantes radioactivos; Hilos; Tubos; Agujas; Cápsulas.
Sistema Renal	Equipos y componentes de diálisis.
Sistema Respiratorio	Respiradores; Componentes para intubación y ventilación pulmonar; Endoscopia, Broncoscopio.
Regeneración Tisular	Preparación de tejidos mediante técnicas de bioingeniería; Tendones, Nervios, Piel, etc.
Cicatrización	Absorbentes; Membranas protectoras; Apósitos; Biofilms; Elementos barrera; Injertos epidérmicos artificiales; Agentes hemostáticos; Suturas; Adhesivos; etc.

1.1.1. BIOMATERIALES PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

La Ingeniería de tejidos es una nueva disciplina que combina los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el conocimiento fundamental de las relaciones estructura-función en tejidos sanos y enfermos y hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que mantengan, reparen o mejoren la función de tejidos u órganos dañados.⁴

Las perspectivas de esta nueva disciplina son enormes tanto desde un punto de vista básico, académico, como desde el punto de vista socioeconómico, y a ella se está dedicando gran esfuerzo desde las instituciones más representativas. En los últimos años, se han ido desarrollando nuevos biomateriales que pueden suplir al tejido u órgano original. El objetivo en Ingeniería de tejidos es superar las limitaciones de los tratamientos convencionales, regenerando tejidos naturales, o creando sustitutos biológicos para defectos o pérdidas de tejidos o órganos, mediante la combinación de biomateriales, células y/o sustancias bioactivas (Fig. 1.2).⁵

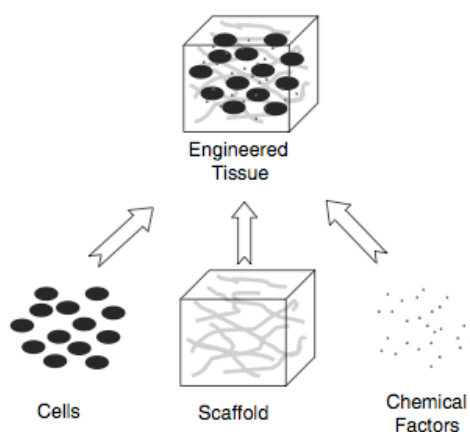


Figura 1.2. Componentes básicos en Ingeniería de tejidos.⁶

Las técnicas empleadas en Ingeniería de tejidos siguen dos metodologías complementarias (Fig. 1.3). La primera se basa en el proceso de regeneración de tejidos a partir de cultivos celulares específicos *in vitro*, utilizando un soporte y su posterior implantación en el organismo. La segunda se basa en la aplicación de un sistema soporte que contiene las sustancias bioactivas necesarias para conseguir activar el proceso de regeneración tisular *in situ*.

En ambos planteamientos es necesario considerar que el aporte de biomateriales proporciona una base o matriz adecuada para conseguir restaurar o regenerar la estructura, la biofuncionalidad, la actividad metabólica y el comportamiento bioquímico, así como las características biomecánicas del tejido.

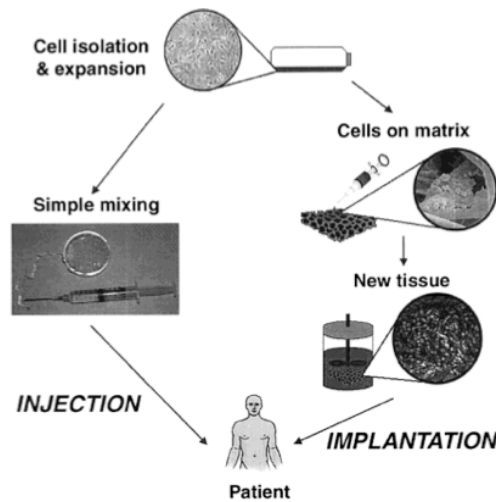


Figura 1.3. Representación esquemática de los dos enfoques típicos de Ingeniería de tejidos.⁷

Para conseguir una regeneración exitosa de los tejidos, se busca la preparación de un material, que imite las características naturales de la matriz extracelular (ECM) (Fig. 1.4), y funcione como un soporte donde las células puedan proliferar y diferenciarse eficientemente. Considerando que cada tejido presenta una ECM distinta, en el diseño del biomaterial es importante imitar las características específicas de la ECM para cada aplicación. Así, la composición básica del material y sus propiedades vendrán marcadas por las propiedades del tejido a imitar (p.e. elasticidad, rigidez, rugosidad, etc...). Por otro lado, existen características comunes para la mayoría de biomateriales, que son buscadas en el diseño de los mismos, como, por ejemplo, la biocompatibilidad o una elevada porosidad.

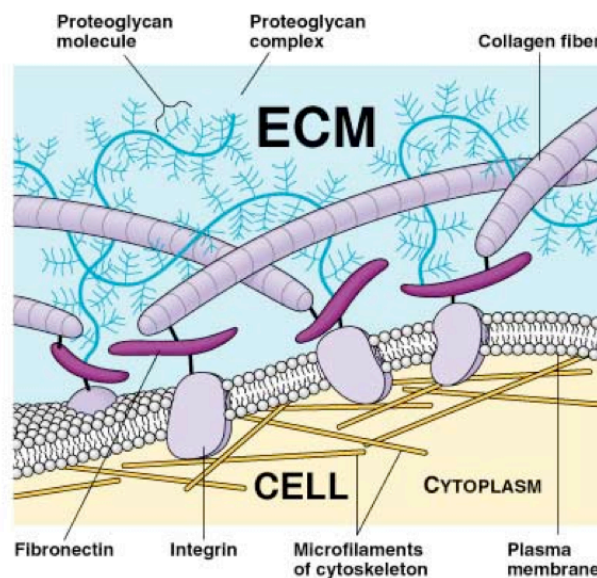


Figura 1.4. Representación esquemática de la matriz extracelular.

1.1.2. SOPORTES TRIDIMENSIONALES POROSOS: *SCAFFOLDS*

La mayoría de los estudios de cultivos celulares se realizan en superficies de dos dimensiones (2D) como placas, frascos de cultivo celular, o placas Petri, debido a su facilidad de uso y a la elevada viabilidad de las células en 2D. Aunque estos sistemas de cultivos convencionales en 2D han hecho posible la comprensión de la biología celular básica, su uso para imitar tejidos naturales es muy limitado, ya que, en un organismo, las células de los tejidos se organizan en estructuras tridimensionales (3D) y, además, cada tipo celular se encuentra en un microambiente 3D considerablemente diferente (Fig. 1.5-A/D/G).

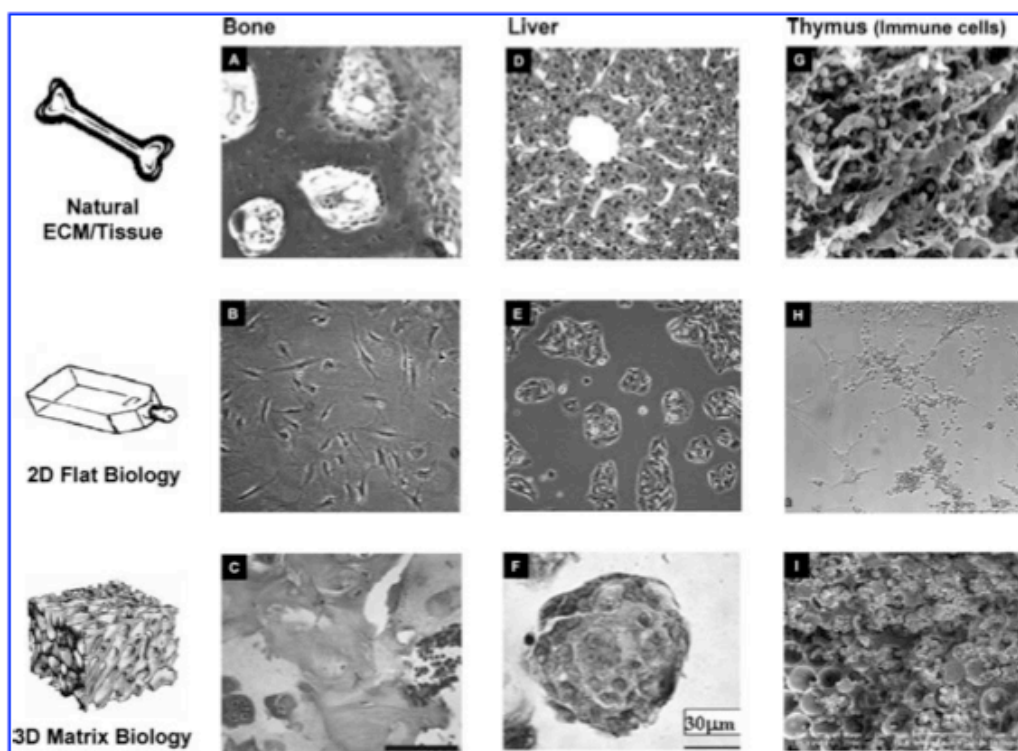


Figura 1.5. Comparación de las células y de la morfología de los tejidos cultivados en sustratos 2D y 3D. Los tejidos y las células de distintos órganos presentan características morfológicas distintas: imágenes histológicas del hueso (A) y del hígado (D), y imagen SEM del timo (G). Cuando las células de los distintos tejidos se cultivan en sustratos 2D, muestran un patrón morfológico similar (de tipo estirado): imágenes de microscopio óptico de los osteoblastos (B), hepatocitos (E) y co-cultivo de linfocitos y células del estroma (H). La morfología celular se vuelve más parecida a la del correspondiente tejido natural cuando se las células se cultivan en soportes 3D: osteoblastos (C), hepatocitos (F) y células mononucleares (I).⁸

En general, cuando las células de los distintos tejidos se cultivan en sustratos 2D, muestran un patrón similar (estirado sobre la superficie) (Fig. 1.5-B/E/H). Por otro lado, la morfología celular se vuelve más parecida a la del tejido natural cuando las células se cultivan en soportes 3D (Fig. 1.5-C/F/I). En este sentido, los sustratos bidimensionales son considerablemente limitados en la emulación de los complejos microambientes 3D. Además, los sustratos 2D requieren una adaptación de las células a un ambiente distinto del original, que puede alterar el metabolismo, y reducir la funcionalidad celular, ya que, las células sin soporte, carecen de la capacidad de crecer con orientaciones 3D y de definir la forma anatómica del tejido. Por lo tanto, para lograr recuperar la funcionalidad de los tejidos y órganos dañados mediante Ingeniería de tejidos, es fundamental diseñar soportes (*scaffolds*) que faciliten la distribución celular y guíen la regeneración tisular en tres dimensiones.⁹ El *scaffold* es, por ello, un componente fundamental en la regeneración tisular.

1.1.2.1. Estructura jerárquica de los soportes tridimensionales

Unos de los objetivos más ambiciosos en el campo Ingeniería de tejidos es el desarrollo de materiales mimetizando la estructura y composición del tejido a regenerar a partir de rutas biomiméticas, es decir, simulando el proceso natural. Muchos científicos se han fascinado por el alto grado de sofisticación y miniaturización de algunos de los materiales naturales.¹⁰⁻¹¹ La naturaleza actúa como una verdadera escuela de ciencia de materiales. En todos los organismos vivos, ya sea básicos o complejos, la naturaleza provee de lo necesario para la fabricación de una multitud de materiales, arquitecturas, sistemas y funciones que están en muchos casos fuera del alcance del ser humano. Los materiales procedentes de la naturaleza están altamente integrados en sus sistemas, formando parte de un equilibrio donde sus propiedades y funciones (propiedades mecánicas, densidad, permeabilidad, hidrofobicidad, etc.) son controladas gracias a la estructura jerárquica de los mismos. El hueso es un ejemplo muy ilustrativo de la compleja organización jerárquica natural, que se manifiesta, a nivel de nanoescala, por la interacción entre los cristales de hidroxiapatita y las cadenas de colágeno, y a nivel de microescala, por la organización entre láminas y osteocitos (Fig. 1.6). Esta complejidad estructural del tejido es la que otorga sus excelentes propiedades mecánicas. Así, en el diseño y la preparación de los biomateriales es fundamental tener un enfoque “multi-escala” o jerárquico.

En general, las múltiples escalas de miniaturización de los soportes se dividen en 3 categorías: macroescala (10^{-1} - 10^{-3} m), microescala (10^{-3} - 10^{-6} m) y nanoescala (10^{-6} - 10^{-9} m).

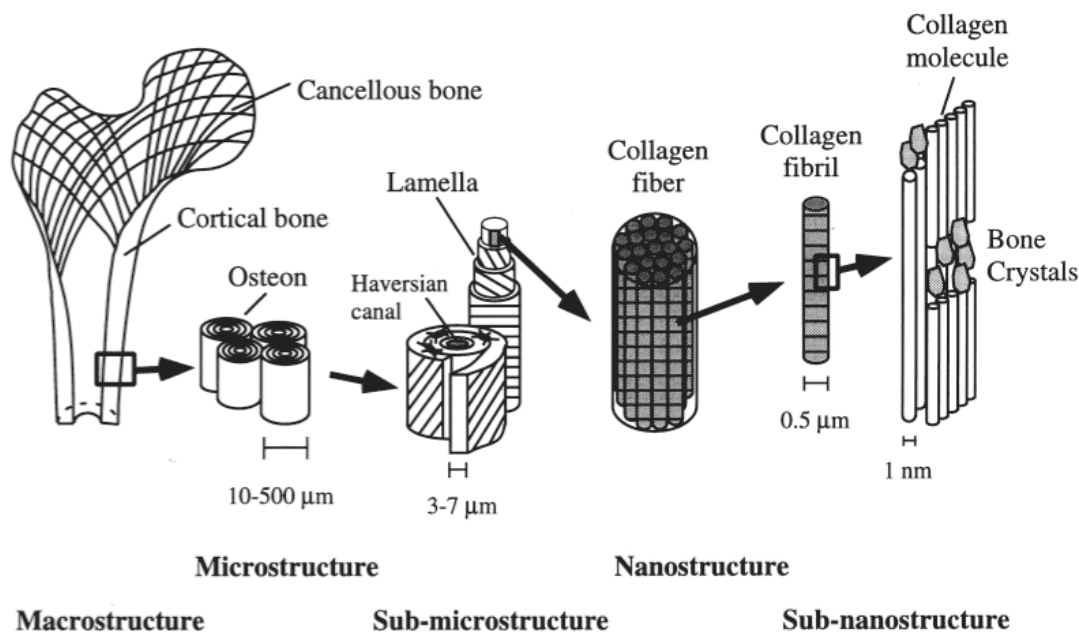


Figura 1.6. Organización jerárquica de la estructura del hueso.¹²

A nivel de macroescala (10^{-1} - 10^{-3} m) es posible definir el tamaño y la forma de los *scaffolds*. En Ingeniería de tejidos, es importante que el tamaño y la forma coincidan con el defecto anatómico a reemplazar, para permitir la integración con los tejidos adyacentes,¹³ o para fines estéticos. Recientemente, el control a este nivel ha mejorado gracias a la visualización por el uso de herramientas informáticas de imágenes médicas, como la tomografía computerizada, o la resonancia magnética de imagen. Además, las modernas tecnologías de modelado rápido (RP), utilizando sistemas multicapa y ayudados por un programa informático de tipo CAD (*computer aided design*) han supuesto un gran avance en la obtención de réplicas de órganos completos y sus partes.¹⁴⁻¹⁵

A nivel de microescala (10^{-3} - 10^{-6} m) el objetivo es imitar la estructura de los tejidos a nivel microscópico, como la organización espacial multicelular dentro de la ECM. La arquitectura de los tejidos y sus funciones están estrechamente interrelacionadas. Por ejemplo, la capa íntima de los vasos sanguíneos presenta una disposición concéntrica de tres capas diferentes, el endotelio, el músculo liso y el tejido conectivo. Una capa circular del músculo liso rodea y orienta longitudinalmente el endotelio interno y el tejido conectivo externo, regulando el flujo de la sangre (Fig. 1.7).¹⁶

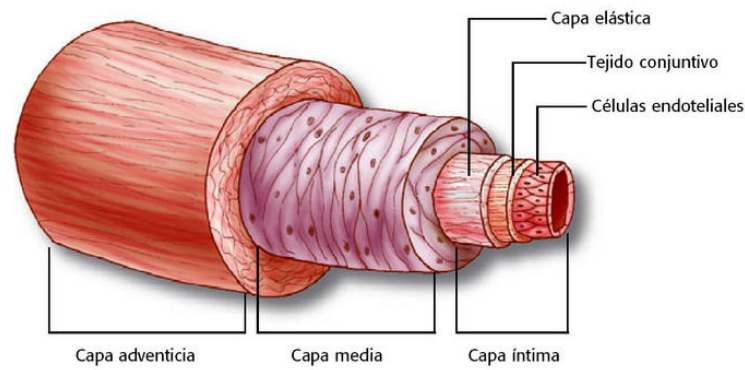


Figura 1.7. Estructura jerárquica de un vaso sanguíneo del sistema cardiovascular.

A pesar de que el diseño de la matriz 3D a nivel de microescala debe ser específico para cada aplicación, existen parámetros comunes a los distintos tejidos, como la porosidad, la interconectividad, la geometría y la distribución de tamaño de poros. En particular, a nivel de microescala, la difusión de los nutrientes, de los desechos metabólicos y de las moléculas solubles, es uno de los factores más críticos que hay que tener en cuenta para favorecer el transporte de masa dentro del *scaffold* y, así, permitir el crecimiento celular.¹⁷ Poros de tamaño suficientemente grande, abiertos y interconectados, mejoran la difusión en todo el soporte y son fundamentales para el éxito del material. El diseño estructural a nivel de microescala también afecta a las propiedades mecánicas del *scaffold*. Por ejemplo, una elevada porosidad sacrifica las propiedades mecánicas por reducción de la cantidad de material presente en la matriz. Así que, un diseño preciso de los soportes, donde la arquitectura está optimizada para proporcionar una completa interconexión y una elevada porosidad, puede mejorar la resistencia mecánica preservando al mismo tiempo la difusión.¹⁸

A nivel de nanoescala, las células interactúan con la ECM mediante las proteínas en respuesta a su entorno, por lo tanto, no es menos importante el diseño de la matriz a este nivel. Se ha demostrado que la topografía de la superficie, a nivel de nanoescala, regula la adhesión, la organización, y la diferenciación celular.¹⁹ Sin embargo, las técnicas de fabricación a este nivel resultan limitadas. Así, mientras algunos métodos buscan el control de la nanoestructura en las condiciones de procesamiento durante la fabricación del material,²⁰⁻²¹ otros, incorporan materiales de tamaño nanométricos en los reactivos antes de la fabricación del soporte (por ejemplo, en la fabricación de tejido óseo se incorporan en la matriz polimérica nanopartículas de hidroxiapatita para mejorar la adhesión y la proliferación de los osteoblastos, así como la

deposición de calcio).²² Recientemente, se han usado también bio-nano-materiales, tales como hidrogeles peptídicos 3D, donde se atrapan las células directamente en la estructura fibrosa.²³

En general, el diseño adecuado de la estructura de los *scaffolds* puede proporcionar características diferentes a distintos niveles en la matriz fabricada (p.e. la forma, a nivel de macroescala, la arquitectura interna, a nivel de microescala, y la topología de superficie, a nivel de nanoescala). El diseño de un *scaffold* debe incorporar todas las escalas para conseguir imitar la estructura jerárquica del tejido natural, y favorecer la organización celular, así como la correcta funcionalidad del nuevo tejido.

1.1.2.2. Propiedades de un biomaterial para Ingeniería de tejidos

Los materiales empleados como soportes en Ingeniería de tejidos deben poseer una serie de requisitos específicos,²⁴ muchos de los cuales dependen directamente de la morfología del *scaffold*, como son una elevada porosidad para favorecer la difusión y la colonización celular,²⁵ o, una elevada interconexión entre los poros para permitir la distribución homogénea de las células, la vascularización del tejido, la difusión de los nutrientes y del oxígeno, así como de los productos de desecho.²⁶⁻²⁷ Además, la morfología del *scaffold* ha de permitir unas adecuadas propiedades mecánicas que faciliten su manipulación e imiten el tejido de implante previsto (p.e., que posea rigidez en aplicaciones de tejido óseo o elasticidad en la aplicación a vaso sanguíneo).²⁸⁻²⁹

Otras características dependen del material de que está hecho el soporte, como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la humectabilidad, la fácil esterilización o las propiedades superficiales.

Como se ha mencionado al principio de la memoria, la biocompatibilidad del material es un parámetro crítico, ya que determina la capacidad de los materiales de llevar a cabo sus funciones en presencia de las células apropiadas. Los requisitos de biocompatibilidad cambian dependiendo de la aplicación específica. El grado de biocompatibilidad puede variar desde la falta de toxicidad con respecto a los cultivos celulares hasta la respuesta inmunológica sistémica a largo plazo del cuerpo humano. Los materiales naturales tienden a mostrar una mejor biocompatibilidad que los materiales sintéticos, pero las fuentes de origen animal crea preocupaciones acerca de la enfermedad de transmisión. Por otro lado, ciertos procesos de fabricación que utilizan productos químicos agresivos, también disminuyen la biocompatibilidad y, a veces, causan toxicidad de la matriz, incluso si los materiales de partida son biocompatibles.

Además de la biocompatibilidad, la biodegradabilidad controlada también es un requisito esencial para los *scaffolds*, ya que estos soportes son generalmente diseñados para degradarse mientras se verifica el crecimiento del tejido que sustituyen.³⁰ Lo más deseable es una degradación progresiva de la estructura promoviendo simultáneamente la regeneración tisular. En general, los materiales sintéticos se degradan por hidrólisis de forma más previsible y regulable,³¹ mientras que los materiales naturales lo hacen mediante procesos enzimáticos, dependientes de la concentración local de enzima segregado por las células.³²⁻³³ El mecanismo de degradación de los materiales y su perfil temporal, en condiciones fisiológicas, son, por tanto, parámetros que hay que considerar cuidadosamente a la hora de diseñar un soporte 3D. Pero, además, hay que tener en cuenta el lugar de implante o la funcionalidad que ha de tener el *scaffold*.

La humectabilidad del *scaffold* es otro parámetro clave.³⁴ Se ha demostrado que un material más hidrofílico favorece una mayor adhesión celular.³⁵⁻³⁶ Por esta razón, los hidrogeles formados por cadenas de polímeros hidrófilos (p.e. poli vinilalcohol (PVA), poli etilenglicol (PEG), etc.) se han utilizado en numerosas ocasiones en la fabricación de los soportes.³⁷

Las propiedades superficiales son otro aspecto crucial en el control de las interacciones entre las células y un sustrato. Las propiedades de la superficie incluyen la rigidez, la carga, la polaridad, y la reactividad química, entre otras. Por ejemplo, la densidad de carga superficial determina la cantidad de adsorción de proteínas y la consiguiente adhesión celular.³⁸⁻³⁹ También, se ha visto que las diferentes especies de proteínas se adhieren al soporte dependiendo de la polaridad de la carga superficial.⁴⁰ Las propiedades superficiales pueden ser moduladas por adición de grupos funcionales específicos o proteínas con funciones biológicas necesarias para regular el comportamiento celular.⁴¹⁻⁴²

1.1.2.3. Materiales para la preparación de *scaffolds*

La selección del material más apropiado para preparar un soporte 3D constituye uno de los aspectos claves para conseguir un resultado positivo, ya que sus propiedades intrínsecas determinarán en gran medida las propiedades del propio biomaterial.

En general, los biomateriales se puede dividir en 4 grupos: metales, cerámicas, polímeros y *composites*. Existen numerosos materiales biocompatibles dentro de los grupos indicados. Sin embargo, los criterios de biodegradabilidad excluyen la utilización de componentes metálicos y gran parte de los cerámicos como materiales soporte en Ingeniería de tejidos. Aunque sí se han empleado algunos materiales cerámicos biodegradables o bioabsorbibles, a base de fosfatos de

calcio, o corales marinos, entre otros. Los materiales poliméricos (naturales o sintéticos) han recibido mucha atención en su uso como biomateriales soporte 3D, debido a su gran flexibilidad en la composición y estructura (Fig. 1.8).⁴³ Así, existe una amplia gama de polímeros que pueden moldearse con relativa facilidad en formas geométricamente complejas, con excelente biocompatibilidad y buen resultado en numerosas aplicaciones biomédicas.

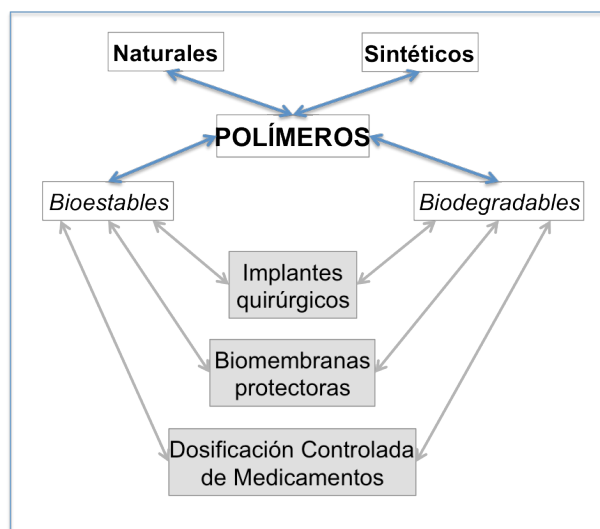


Figura 1.8. Campos de aplicación más importantes de los polímeros en Biomedicina y Cirugía.⁴⁴

Algunos polímeros de origen sintético, aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*), se emplean habitualmente en Ingeniería de tejidos, como los poliésteres alifáticos, como PGA (ácido poliglicólico), PLLA (ácido poliláctico), sus copolímeros, como PLGA, y PLC (poli ϵ -caprolactona).⁴⁵⁻⁴⁶ La mayor ventaja de los polímeros sintéticos se encuentra en el elevado control de sus propiedades (p.e. peso molecular y distribución de peso molecular) durante el proceso de síntesis. Como desventaja presentan la dificultad de modificar su superficie con factores de crecimiento, de diferenciación y/o de adhesión celular.

Entre los polímeros de origen natural, lo más empleados son las proteínas (colágeno o gelatina) y los polisacáridos (p.e. ácido hialurónico, alginato, quitosano).⁴⁷ Éstos ofrecen la ventaja de ser muy similares, y a menudo casi idénticos, a las sustancias macromoleculares que el medio biológico es capaz de reconocer y metabolizar. De esta manera se evitan los problemas derivados de la toxicidad y estimulación de una respuesta inflamatoria crónica. Por otra parte, los polímeros naturales frecuentemente son demasiado inmunogénicos. Su complejidad estructural, mucho mayor que los polímeros sintéticos, requiere de una manipulación tecnológica específica y elaborada. En particular, la extracción de estos polímeros

a partir de fuentes naturales hace que pueda haber variaciones estructurales. Una característica particular de los polímeros naturales es la habilidad para ser degradados por enzimas presentes naturalmente en organismos vivos, así que el implante será eventualmente metabolizado por los mecanismos fisiológicos. Por otra parte, la velocidad de degradación del material implantado puede controlarse mediante modificaciones químicas o entrecruzamiento, permitiendo el diseño de implantes con determinado grado de duración.⁴⁸

1.1.2.4. Métodos de procesamiento de soportes poliméricos

El procesamiento de polímeros es clave para conseguir soportes de propiedades y comportamiento apropiado y, en este sentido, el desarrollo de metodologías reproducibles y escalables es necesario para preparar soportes adecuados con propiedades óptimas. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, las técnicas de procesamiento deben proporcionar soportes con una geometría 3D, porosidad controlada y adecuada distribución de poros, ya que estos factores están asociados a los procesos de nutrición y crecimiento celular y, por lo tanto, resultan decisivos en la regeneración tisular. Las distintas técnicas de procesamiento desarrolladas han permitido un diseño cada vez más preciso de los *scaffolds*, controlando las propiedades del material, como el tamaño y la forma de la matriz, la topología de la superficie, o el tamaño, la geometría y la interconexión de los poros. Aunque todos los métodos de fabricación tienen ventajas únicas, no existe un proceso de fabricación estándar. Cada técnica de elaboración confiere al *scaffold* características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del *scaffold*. A continuación se mencionan algunas de las diferentes técnicas de fabricación.

La “evaporación de disolventes y disolución de partículas” (*particulate-leaching*) constituye uno de los métodos más sencillos y económicos para preparar soportes porosos de forma homogénea. Consiste en dispersar partículas inorgánicas solubles en agua (p.e. cloruro sódico) o partículas orgánicas (p.e. sacarosa cristalizada) en una disolución concentrada de un determinado sistema polimérico. La mezcla es colada en un molde donde el disolvente se evapora. A continuación, se disuelven selectivamente las partículas dispersadas dando lugar a los diferentes poros.⁴⁹⁻⁵⁰ La porosidad y el tamaño de poros puede controlarse independientemente variando la cantidad y el tamaño de las partículas dispersadas. Para eliminar el uso de disolventes orgánicos tóxicos, también se puede usar un gas como agente porógeno (como el CO₂ a altas presiones), éste es el caso del método definido como *gas foaming*.⁵¹

La técnica de “procesado de fibras” (*fiber bonding*) consiste en la formación de uniones físicas entre fibras poliméricas mediante un proceso de fusión, a una temperatura superior a la de fusión del polímero, originando un entramado de fibras.⁵² La ventaja más característica de los sistemas de malla de fibras es su elevada área superficial para conseguir una rápida difusión de nutrientes que permita la supervivencia y crecimiento celular. Una limitación importante es, sin embargo, su reducida estabilidad estructural. Además, el empleo de disolventes orgánicos hace que los *scaffolds* preparados con este método resulten poco biocompatibles.

El método de “separación de fases” (*phase separation*) permite trabajar con un sistema multicomponente homogéneo, que en determinadas condiciones, como por la variación de temperatura, se vuelve termodinámicamente inestable y permite la separación en distintas fases. La eliminación del disolvente por sublimación permite obtener un soporte poroso.

Mediante “liofilización” (*freeze drying*) se preparan matrices porosas a partir de una disolución polimérica que se congela y se liofiliza.⁵³⁻⁵⁴ El proceso de congelación inicial provoca la formación de cristales de hielo en la dispersión (o disolución), con la agregación del soluto en los espacios intersticiales. El consiguiente proceso de liofilización retira los cristales de hielo con la formación de la estructura porosa.⁵⁵⁻⁵⁶

Tecnologías de modelado rápido, tales como las de impresión en tres dimensiones o las de deposición/fusión FDM (*Fusion Deposited Modeling*), permiten crear soportes porosos que mimetizan la microestructura de los tejidos vivos. Las tecnologías de impresión 3D están basadas en la proyección de un aglomerante o adhesivo a través de una boquilla sobre un lecho de polvo. El dispositivo se desarrolla mediante la adición de capas secuenciales y el proceso se realiza a temperatura ambiente. El proceso FDM consiste en la extrusión de un filamento de polímero por una boquilla caliente y su deposición sobre una bandeja, siendo inicialmente diseñado mediante un modelo geométrico elaborado por CAD. Actualmente, es una técnica muy estudiada para intentar controlar, de forma simultánea, las propiedades macroscópicas y microscópicas de los *scaffolds*.⁵⁷⁻⁵⁸

1.1.2.5. Aplicación de *scaffolds* en Ingeniería de tejidos: estado del arte

Distintos estudios han demostrado la formación de tejido en cultivos celulares sobre *scaffolds* poliméricos.⁵⁹⁻⁶⁰ Sin embargo, este hito no está exento de problemas, como se ha observado que en la degradación de los polímeros sintéticos, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se generan productos de desecho que resultan incompatibles con el crecimiento del tejido. Por ejemplo, la degradación de los soportes de PLLA produce ácido láctico,⁶¹ que determina una

reducción del pH, generando a su vez un aumento de la velocidad de degradación de la matriz mediante autocatálisis,⁶² por la formación de un ambiente muy ácido alrededor del polímero, entorno que también puede afectar negativamente a la función celular, ya que incluso pequeños cambios de pH (de 7.4 a 6.8) en el microambiente alrededor del soporte pueden afectar significativamente a la viabilidad celular.⁶³ También, se ha descubierto que la posible liberación de partículas durante la degradación polimérica puede afectar a los procesos de remodelación ósea,⁶⁴ y provocar una respuesta inflamatoria.⁶⁵⁻⁶⁶ Por otra parte, los actuales polímeros sintéticos no son fácilmente reconocidos por las células del tejido, ya que, *in vivo*, éstas se encuentran en contacto con la ECM formada por otros biopolímeros, como colágeno, elastina, glucoproteínas, o proteoglicanos, entre otros.⁶⁷⁻⁶⁸ Respecto a los polímeros naturales de origen animal, como el colágeno, aunque se ha demostrado que sus *scaffolds* presentan una superficie que se parece más a la natural, en su aplicación se ha de tener en cuenta que pueden provocar una respuesta inmune.⁶⁹

El reto de la Ingeniería de tejidos es imitar lo que ocurre en la naturaleza, y por ello, se están haciendo numerosos esfuerzos para diseñar *in vitro* prácticamente todos los tejidos y órganos en el cuerpo. En particular, se está trabajando en la creación de tejido modificado de hígado, nervios, riñones, intestino, páncreas, e incluso, músculo del corazón. Hasta la fecha, las tasas más altas de éxito en la producción de nuevos tejidos e implantes en pacientes, se han logrado con tejidos de piel,⁷⁰ vejiga,⁷¹ secciones de vías respiratorias⁷² y hueso.⁷³⁻⁷⁴ Los avances en este sector han crecido de manera exponencial, y un número siempre creciente de productos ya se ha introducido en el mercado o ha llegado a los ensayos clínicos. Actualmente, las ventas de biomateriales regenerables supera los 240 millones de dólares al año,⁷⁵ y se mantiene una continua investigación en distintos sectores.⁷⁶ Por ejemplo, la falta de la vascularización en los *scaffolds* implantados es uno de los retos más importantes en esta materia, de forma que, actualmente, la mejora de las estrategias de vascularización es considerada una de las áreas punteras en investigación.⁷⁷⁻⁷⁸

Muchos médicos clínicos ponen en duda la eficacia de los tejidos fabricados *in vitro*, debido a la necesidad de al menos dos intervenciones quirúrgicas en el paciente, y al retraso en el tratamiento, mientras el tejido es cultivado *in vitro*. Desde una perspectiva comercial, este enfoque también plantea problemas a la hora de encontrar una aprobación legislativa para su uso clínico. Sin embargo, para tejidos como el cartílago, que no tienen capacidad de regenerarse una vez dañados, la Ingeniería de tejidos *in vitro* puede ser la única solución de tratamiento. En el caso de otros tejidos, como por ejemplo el hueso que tiene una capacidad

intrínseca para repararse y remodelarse, la tarea de la Ingeniería de tejidos es tratar de aprovechar esta capacidad de regeneración innata. Una forma de hacerlo es diseñar *scaffolds* que proporcionen señales para la regeneración, evitando así los prolongados cultivos *in vitro* antes del implante. En la actualidad, numerosas investigaciones se dedican al desarrollo de sofisticados materiales biomiméticos multifuncionales que resulten bioactivos a ciertos estímulos celulares.⁷⁹

Se ha observado que el sustrato del material puede regular tanto el comportamiento de maduración de las células,⁸⁰⁻⁸¹ como la diferenciación de células madre.⁸² Por ejemplo, se ha observado que cuando las células madre mesenquimales crecen sobre geles que imitan la elasticidad de los músculos, se genera una diferenciación hacia una línea miogénica (con la formación de músculo), mientras que cuando las mismas células crecen en geles rígidos que imitan hueso pre-calcificado se diferencian hasta una línea osteogénica.⁸³ De modo análogo, se favorece la diferenciación de las células madre neurales a neuronas cuando los *scaffolds* se preparan con materiales blandos y se parecen al tejido cerebral, mientras que la diferenciación hacia células de glía se promueve en presencia de *scaffolds* más rígidos.⁸⁴ Por lo tanto, aprovechando de las características celulares, hoy en día, los estudios se dirigen al desarrollo de biomateriales con propiedades mecánicas específicas, que puedan ser utilizados para dirigir el comportamiento de las células con las que interaccionan.⁸⁵⁻⁸⁶ Además de las señales biomecánicas, el comportamiento celular depende de las señales bioquímicas y de la biología de la matriz extracelular. Por lo tanto, el uso de *scaffolds* como sistemas de administración de factores de crecimiento, citoquinas y péptidos de adhesión está recibiendo una atención considerable y creciente.⁸⁷⁻⁸⁸

Otras áreas de gran interés, se centran en el control y la comprensión de la respuesta inmune del tejido o la prevención de la infección tras el implante. En este caso, la incorporación de fármacos (como inhibidores, antiinflamatorios y/o antibióticos) en los *scaffolds* es un método para reducir la posibilidad de infección después de la cirugía.⁸⁹ Finalmente, el uso de *scaffolds* como los sistemas de liberación de genes terapéuticos también está recibiendo una gran atención.⁹⁰⁻⁹¹ La terapia génica puede ser una herramienta valiosa que evite las limitaciones de la administración local de factores de crecimiento. La escasa distribución en el organismo de este tipo de agentes, provoca la necesidad de administrar elevadas dosis de los mismos, o la necesidad de aplicaciones repetitivas, con los consiguientes altos costes asociados.⁹²⁻⁹³

1.2. PROCESO CRIOGÉNICO: METODOLOGÍA ISISA⁹⁴⁻⁹⁵

La metodología ISISA (*Ice Segregation Induced Self-Assembly*) es un proceso *bottom up* *criogénico*, sencillo, y versátil, adecuado para preparar estructuras 3D macroporosas de una gran variedad de materiales de distinta naturaleza a partir de hidrogeles, disoluciones o dispersiones acuosas.

1.2.1. ORIGEN DE LOS CRIOGELES

Un proceso criogénico consiste en el congelado y el posterior descongelado (por fusión o liofilización) de precursores de bajo o alto peso molecular que forman una disolución, un sistema coloidal en suspensión acuosa, o incluso, un hidrogel.

El hielo es una fase pura, o con un límite de solubilidad de impurezas muy bajo, ya que la rigidez del entramado cristalino expulsa fuera todo aquello que no encaja en la red. Cuando se congela una disolución, una suspensión acuosa o un hidrogel, la formación de hielo cristalino provoca que estos solutos, inicialmente dispersos en el medio acuoso, sean exudados hacia las fronteras entre cristales adyacentes, formando una matriz o acumulándose alrededor de ellos. Éste es el principio natural en el que se basa el procedimiento de autoensamblado mediante moldeado en hielo (Fig. 1.9).

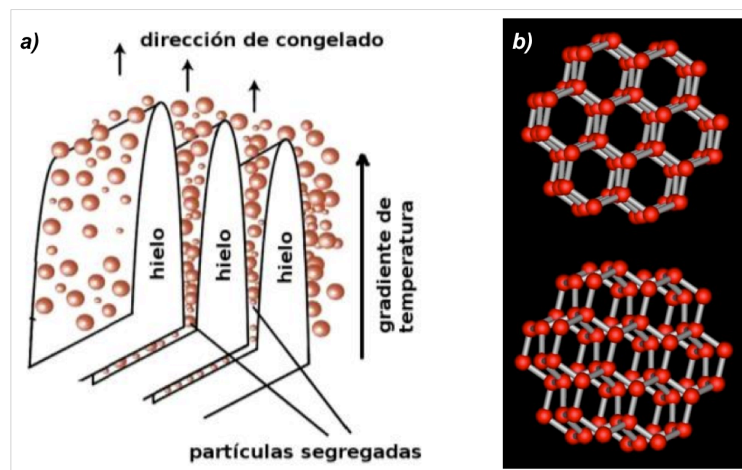


Figura 1.9. (a) Patrón de formación de los canales de hielo y de la segregación de las partículas durante el proceso de congelado de una suspensión de alúmina.⁹⁶ (b) Estructura cristalina del hielo hexagonal.

Si tras el proceso de congelado tiene lugar un proceso de liofilización (sublimación de hielo a baja presión), se obtiene como resultado un *criogel* (palabra que proviene del vocablo griego *κρυος* -kryos- que significa “escarcha” o “hielo”). Los criogeles son estructuras macroporosas

caracterizadas por paredes de materia rodeando áreas vacías donde originalmente se encontraban los cristales de hielo. El proceso de liofilización permite la preparación de soportes monolíticos (*scaffolds*) que mantienen el tamaño y la forma de los recipientes que los contenían durante el proceso de congelado (Fig. 1.10).

Las primeras publicaciones donde se emplea esta técnica son relativas a la preparación de criogeles poliméricos, y datan de hace más de 40 años. Desde entonces, se han fabricados criogeles poliméricos de diferente composición que, gracias al carácter biocompatible del proceso de moldeado de hielo, encuentran aplicación en distintos campos de la biomedicina. En los últimos años se han preparados criogeles de gelatina, de colágeno/elastina,⁹⁷ colágeno/glicosaminoglicano,⁹⁸ quitosano/ácido poliglutámico,⁹⁹⁻¹⁰⁰ PGA y PGLA,¹⁰¹⁻¹⁰² o hidrogeles de albúmina entrecruzada con polivinilpirrolidona,¹⁰³ entre otros. Este proceso criogénico ha llevado o extendido también a la preparación de criogeles de naturaleza cerámica.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ En todos los casos, el punto de partida es la preparación de una solución/suspensión acuosa o de un hidrogel, y el proceso transcurre en ausencia de reacciones químicas o procedimientos químicos adicionales. Con este método, se evitan los inconvenientes asociados a la presencia de subproductos, como el empleo de procesos para la eliminación de moldes (p.e. el uso de altas temperaturas o disolventes). Es preciso destacar la gran versatilidad de la metodología ISISA, ya que permite la preparación de *scaffolds* con una gran variedad de composiciones (inorgánicas, orgánicas, híbridas, bio-híbridas, *composites* y *biocomposites*). Como veremos, el proceso es sencillo, y la microestructura final siempre una réplica de los cristales de hielo. Sin embargo, esta simplicidad no implica una falta de control en la morfología final.

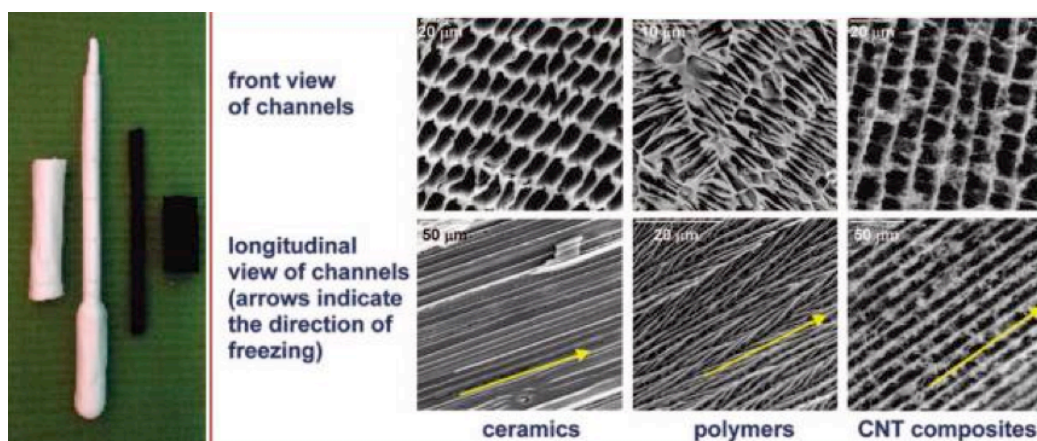


Figura 1.10. Izquierda: Fotografía de los criogeles monolíticos de diferente naturaleza, con diferentes tamaños y formas, obtenidos por el proceso de moldeado por hielo (de izq. a der., materiales cerámicos, poliméricos y *composites* de nanotubos de carbono). Derecha: microfotografías de SEM de secciones transversales (arriba) y longitudinales (abajo) de los diferentes *composites*.⁹⁴

1.2.2. CONTROL DE LA MORFOLOGÍA EN EL PROCESO ISISA

Al principio, el control de la morfología de los criogeles obtenidos con el proceso de moldeado de hielo era sólo parcial. En la actualidad se ha demostrado la capacidad de este método para controlar la morfología de las estructuras macroporosas resultantes, mediante el desarrollo de un proceso de congelado unidireccional y a velocidad de inmersión controlada,¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ que permite la obtención de estructuras con microcanales bien alineados en la dirección de congelado (Fig. 1.11). Sumergiendo la muestra a velocidad constante en un líquido criogénico, la distancia desde el nivel de inmersión en el baño frío al frente de avance del hielo se estabiliza en un determinado punto. A partir de este momento, al no variar la temperatura de congelación, los cristales crecen con un tamaño uniforme. De esta forma se consigue una estructura homogénea de cristales de hielo alineados en la dirección de congelado. Tras el liofilizado de estas muestras se obtienen estructuras macroporosas que reproducen patrones ordenados y bien definidos. En la figura 1.11 se representa esquemáticamente este proceso de moldeado con hielo que conduce a la formación de estructuras organizadas jerárquicamente y que se ha definido como proceso de autoensamblado inducido por segregación de hielo o ISISA.

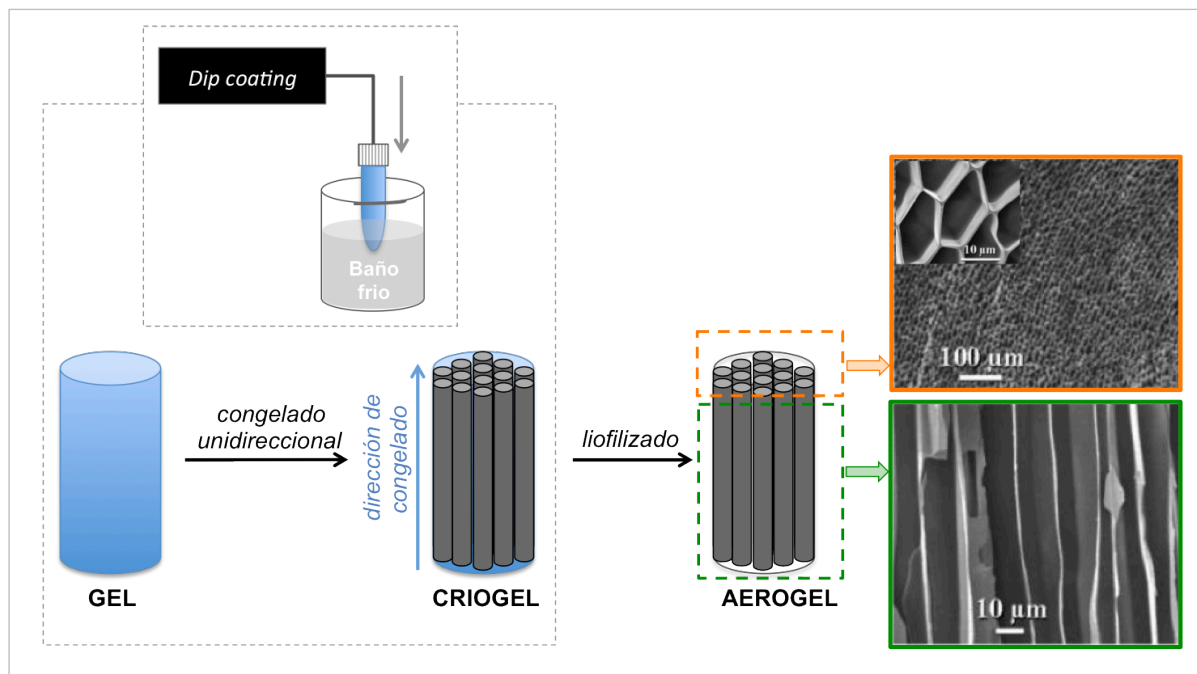


Figura 1.11. Esquema del proceso ISISA. A la derecha, micrografías SEM¹⁰⁸ de secciones de estructuras obtenidas empleando esta metodología: sección perpendicular a la dirección de congelado (arriba); sección paralela a la dirección de congelado donde se observa la microestructura de canales.

Analizando la heterogeneidad de la morfología de los criogeles en la dirección de congelado,¹⁰⁹ se ha demostrado que los criogeles presentan tres zonas diferenciables, caracterizadas por una forma y tamaño de poros específicas (Fig. 1.12). La zona inicial, más cercana al punto inicial de congelado, no presenta porosidad alguna y el material es denso. En la segunda zona, el material se caracteriza por tener una morfología celular, con un tamaño de poro pequeño y una escasa interconectividad. Finalmente, en la zona superior o tercera zona, se observa una estructura laminar con una porosidad más abierta y interconectada, y con una microestructura de canales o de láminas alineadas en paralelo siguiendo la dirección de congelado. Estos cambios de estructura son una réplica negativa de la transición progresiva de la morfología del frente del hielo, de plano celular a laminar. Aunque para obtener hielo amorfo a partir de agua pura son necesarias velocidades de congelación de $\approx 10^6$ °C/s,¹⁰⁹⁻¹¹⁰ cuando se introduce una disolución o una suspensión acuosa o un hidrogel en un baño de nitrógeno líquido (-196 °C) el agua puede sobreenfriarse y congelarse formando hielo amorfo. La presencia de impurezas dificulta la ordenación de las moléculas de agua en la red cristalina de hielo, lo que permite la formación de hielo amorfo en la zona inicial de la muestra al ponerse en contacto con el baño frío,¹⁰⁸ donde quedan atrapados los solutos. Para que las partículas puedan ser exudadas por el frente de hielo es necesario que exista una película líquida de un grosor suficiente entre el frente de hielo y las partículas de soluto, para poder mantener el aporte de moléculas de agua hacia el cristal. El grosor de esta película disminuye al aumentar la velocidad de avance del frente de hielo. Hay una velocidad crítica (v_c) a partir de la cual el grosor de esta película no es suficiente para permitir el flujo de moléculas necesario para mantener el crecimiento de los cristales entre los solutos. Entonces, en lugar de producirse la separación de fases, los solutos quedan entremezclados en el hielo amorfo. La velocidad de congelación a la que sucede esto (velocidad crítica) es distinta para cada material, y depende del tamaño de partícula ($v_c \propto 1/R$) y de la viscosidad del medio ($v_c \propto 1/\eta$), además de la temperatura de congelación, que a su vez depende de la distancia con respecto al nivel del baño frío. Donde “ R ” es el radio de la partícula, y “ η ” la viscosidad del medio.

Mientras tanto, se puede visualizar el avance del frente de hielo a lo largo de la porción no sumergida. La temperatura del frente del hielo es, obviamente, más alta que la de nitrógeno líquido. Cuanto mayor sea la distancia entre el frente de hielo y la zona de inmersión en nitrógeno líquido, mayor será la temperatura del frente, llegando a una situación en la que la temperatura no es lo suficientemente baja como para subenfriar el agua, con lo que se empieza

a formar hielo cristalino, en lugar de hielo amorfo. Así que, el tamaño de poro depende de la distancia comprendida entre el nivel de inmersión en nitrógeno líquido y el frente del avance del hielo. En la zona 2, los poros son de menor tamaño porque la temperatura es más próxima a la del baño frío, mientras que en la zona 3, los poros son de mayor tamaño, ya que la temperatura también es mayor y la segregación del hielo es más eficaz. Por este motivo, el *scaffold* resultante muestra una heterogeneidad longitudinal en el tamaño de poros. La homogénea formación de una estructura con microcanales homogénea, a partir de un determinado momento, es posible gracias a la inmersión parcial y continua (a velocidad constante) en el baño frío.

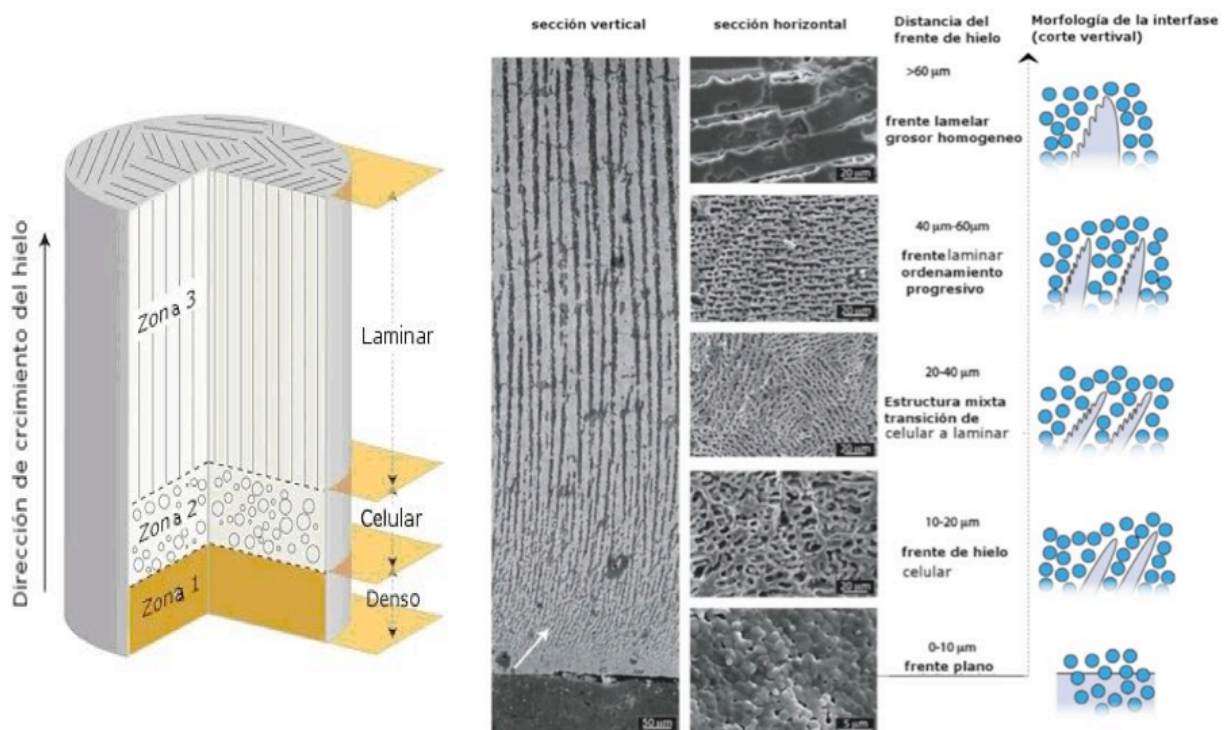


Figura 1.12. Esquema y micrografías SEM de la microestructura final de una muestra de alúmina.^{96,109} La sección de corte paralela a la dirección de congelado muestra la evolución de la estructura porosa, y reproduce la morfología del frente del hielo (esquemático a la derecha). También se observa cómo el grosor de las paredes aumenta con la distancia a la fuente de frío hasta llegar a hacerse constante.

Como se ha comentado anteriormente, las propiedades de los *scaffolds* macroporosos dependen de su estructura interna. Por ejemplo, las propiedades mecánicas varían en función de la porosidad y del grosor de las paredes. Controlando las variables que intervienen en el proceso criogénico (temperatura, concentración, tipo de polímero, velocidad de congelado, etc.) es posible controlar, al menos parcialmente, la morfología final de las estructuras

macroporosas. De esta forma se pueden optimizar los procesos de congelación con el fin de obtener estructuras con las características más adecuadas para cada aplicación.

1.2.2.1. Influencia de la concentración y naturaleza de los materiales

La formación de cristales grandes o pequeños durante el congelado está también relacionada con la concentración y el tipo de soluto.

La capacidad de crecimiento de un cristal de hielo en presencia de un determinado soluto depende del balance de adsorción/desorción del soluto sobre su superficie. Una adsorción irreversible puede desfavorecer completamente la formación de hielo cristalino, mientras que la desorción total permite el crecimiento libre de los cristales. En la práctica existe un equilibrio dinámico entre adsorción y desorción en el que el área superficial cubierta por el soluto marca la efectividad de la inhibición del crecimiento. Así, al aumentar la concentración o el tamaño del soluto disminuye el tamaño de los cristales de hielo.¹¹¹ Jugando con la concentración inicial de la muestra se puede controlar la porosidad final de la macroestructura (Fig. 1.13).

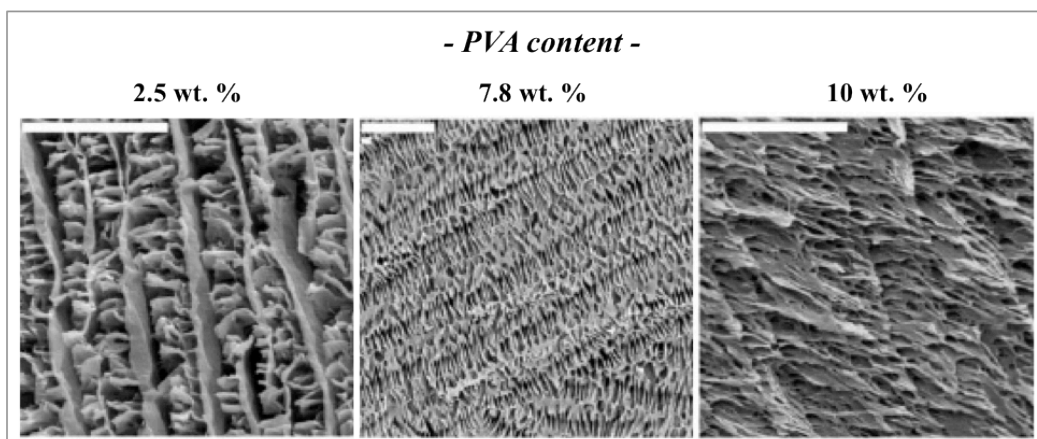


Figura 1.13. Micrografías de SEM que revelan la influencia de la concentración de la suspensión de partida en la microestructura de los scaffolds. Se muestran secciones perpendiculares a la dirección de congelado de criogeles de PVA preparados a partir de suspensiones en peso al 2.5% (izquierda), 7.8% (centro) y 10% (derecha).¹¹¹

Al disminuir la concentración inicial de la muestra, se obtienen *scaffolds* con mayor porosidad, pero con peores propiedades mecánicas, debido a la escasa cantidad de materia que sostiene la estructura. En cambio, muestras muy concentradas pueden inhibir el crecimiento de los cristales de hielo, perdiendo la interconectividad en la porosidad de los *scaffolds* finales. La concentración a la cual la materia queda atrapada en el hielo amorfo depende del tamaño de partícula (o de su peso molecular, en el caso de muestras poliméricas), ya que, como se ha mencionado anteriormente, la velocidad crítica de avance del frente de hielo a partir de la cual

las partículas dejan de ser exudadas es inversamente proporcional a su tamaño. Así, la porosidad de los *scaffolds* preparados a partir de muestras con igual concentración de un determinado soluto aumenta con la disminución del tamaño de partícula del soluto.

Otra característica microestructural interesante es la formación de puentes interlaminares cuando la concentración de soluto alcanza determinados valores, que también varían en función de la naturaleza del soluto. En materiales cerámicos estos puentes son delgados y a menudo originan morfologías tortuosas e irregulares, apareciendo sobre todo en suspensiones concentradas y a velocidades lentas de congelación (Fig. 1.14). Sin embargo, en materiales híbridos los puentes son más regulares y aparecen a valores intermedios de concentración y velocidad de congelado. Los mecanismos de formación de estos puentes todavía no se han aclarado. Se ha propuesto que la causa de su formación es una segunda inestabilidad, perpendicular a la dirección de congelado, debida a la acumulación de materia alrededor de los cristales crecientes, que da lugar a unas segundas celdas de hielo.¹¹²

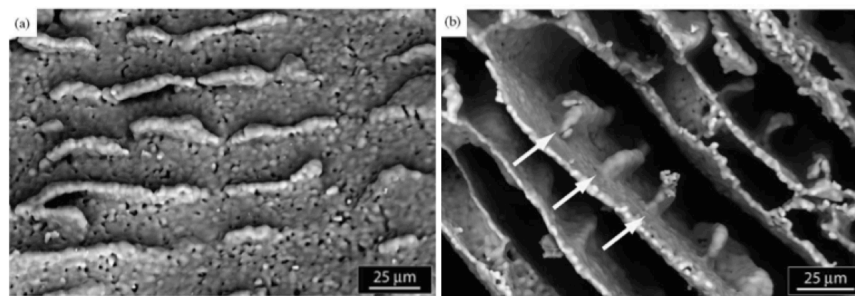


Figura 1.14. Micrografías SEM mostrando dendritas orientadas en la dirección de congelado en la superficie de una muestra porosa de hidroxiapatita. Secciones paralelas (a) y perpendiculares (b) a la dirección de congelado.¹⁰⁹

1.2.2.2. Influencia de la velocidad de inmersión

En función de la velocidad de inmersión, el frente de hielo avanza a lo largo de la muestra más o menos próximo al nivel del nitrógeno líquido. Así, a velocidades más rápidas la distancia del frente de hielo al nivel de inmersión es menor, pudiendo llegar incluso a coincidir. La temperatura del frente va a ser muy baja y la congelación de las muestras más rápida, provocando la formación de cristales más pequeños. La cantidad de materia exudada por cada uno de estos cristales será menor, lo que origina arquitecturas de paredes delgadas y canales estrechos. En cambio, si se sumerge más lentamente la muestra en el baño frío, el frente de hielo se distancia más del nivel de inmersión. En estas condiciones aumenta la temperatura de congelación de la muestra, lo que permite un mayor crecimiento de los cristales, provocando la

acumulación de una mayor cantidad de materia a su alrededor, que favorece la formación de arquitecturas con canales amplios y paredes gruesas (Fig. 1.15).

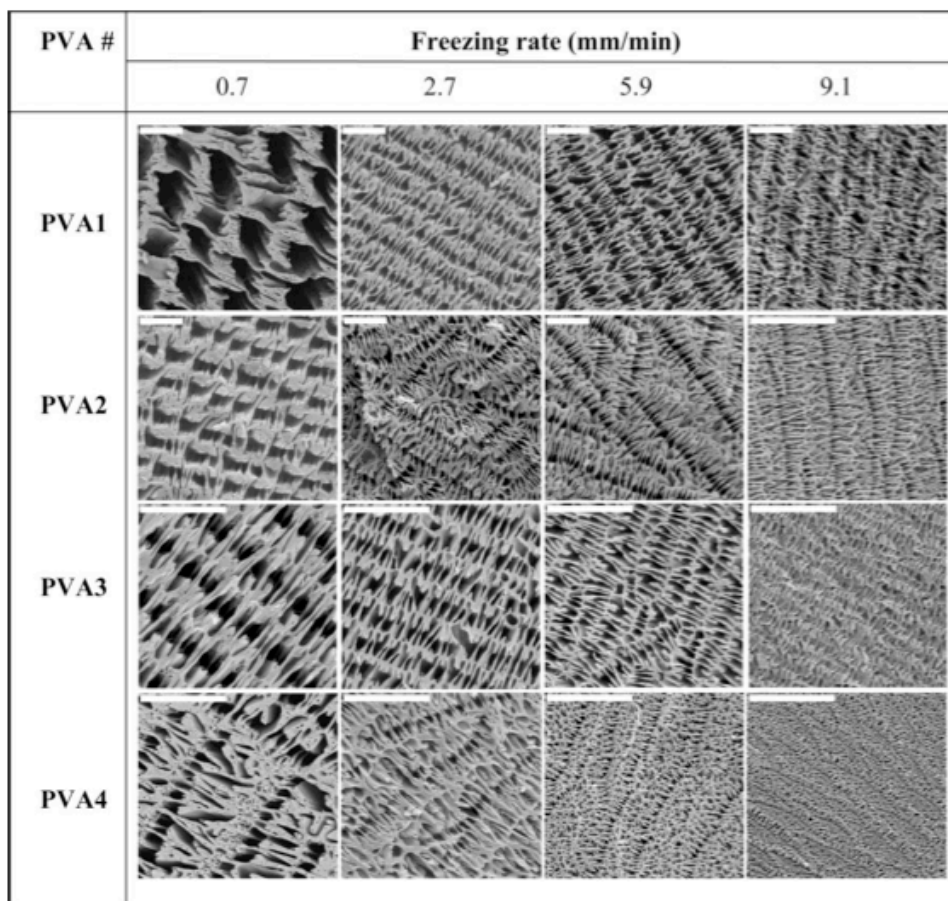


Figura 1.15. Influencia de tamaño y velocidad de congelado. Micrografías de SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de PVA. Las morfologías se obtuvieron usando PVA con diferentes pesos moleculares (PVA1, PVA2, PVA3 y PVA4 que corresponden a 13000-23000, 72000, 89000-98000 y 130000 g/mol, respectivamente) y procesando las soluciones acuosas de PVA a diferentes velocidades de inmersión en nitrógeno líquido. El contenido de PVA es de 7,8% p/V para cada muestra.¹¹³ Barra de escala: 20 μ m.

1.2.2.3. Influencia de la temperatura de congelación

Las diferencias de tamaño de poro y estructura interna de los hidrogeles también dependen de la variación de temperatura de congelado (Fig. 1.16).¹¹⁴⁻¹¹⁵ A temperaturas de congelado más altas, el número de núcleos cristalización del hielo que se forman inicialmente, es menor que en un proceso de congelado a temperaturas inferiores. Este hecho, junto con el mayor tiempo necesario para la formación de los cristales de hielo, favorece un aumento del tamaño de los mismos que, a su vez, da lugar a un aumento del tamaño de los poros en los hidrogeles. Así, se ha observado como un proceso de congelado en nitrógeno líquido (-196 °C) produce *scaffolds*

con poros más pequeños que los obtenidos mediante proceso de congelación lento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En otras palabras, se ha demostrado que la diferencia en la estructura interna y el tamaño de los poros depende de la diferente transferencia de calor durante el proceso de congelación de los hidrogeles.

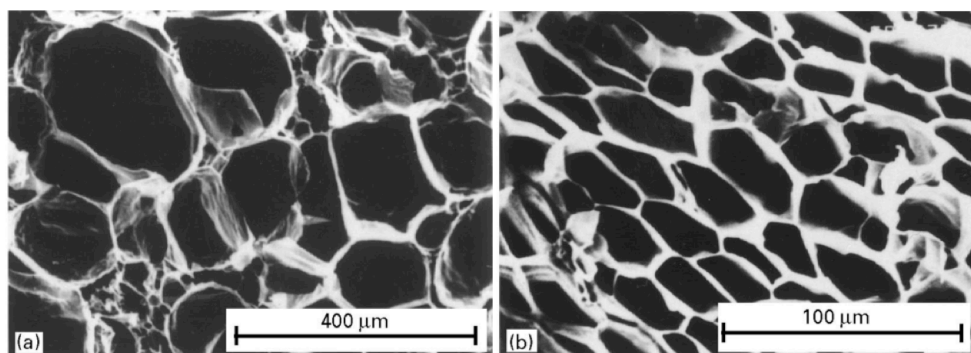


Figura 1.16. Micrografías de SEM de secciones transversales (perpendiculares a la dirección de congelado) de *scaffolds* de gelatina congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b).¹¹⁴

1.2.3. APLICACIONES Y VERSATILIDAD DE LA METODOLOGÍA ISISA

La metodología ISISA es un proceso versátil, adecuado para preparar materiales de muy diversa composición y aplicaciones. Por ejemplo, el grupo de Tamon ha fabricado monolitos de sílice coloidal que, además de poseer la macroporosidad típica de estas estructuras 3D, también poseen micro- y mesoporosidad en sus paredes.¹⁰⁸ La microporosidad se debe a los huecos que quedan entre los coloides de sílice al empaquetarse formando las paredes alrededor de los canales de hielo. Este mismo fenómeno se ha observado también preparando hidrogeles mixtos de sílice y alúmina, a partir de los cuales se obtienen *scaffolds* compuestos con una red polimérica de Al-O-Si.¹¹⁶ Este mismo grupo ha empleado este proceso criogénico para construir fibras porosas de titanio,¹¹⁷ y *composites* de carbono a partir de resinas fenólicas obtenidas mediante un proceso sol-gel de policondensación de resorcinol y formaldehído.¹¹⁸⁻¹¹⁹ En este tipo de materiales, la estructura de macroporos alineados e interconectados proporciona un buen sistema de transporte, mientras que la micro y la mesoporosidad multiplican su superficie reactiva, ofreciendo prometedoras aplicaciones como soportes catalíticos, adsorbentes, o columnas cromatográficas.

La versatilidad de la metodología ISISA también ha permitido la combinación entre micro y nanoestructuras. Por ejemplo, el grupo de Stucky ha empleado el proceso criogénico para preparar fibras organo/inorgánicas (INP@PINPAm), ensamblando partículas inorgánicas (INP) con un polímero (poli-isopropilacrilamida, PNIPAm) a baja concentración.¹²⁰ En otro trabajo

del mismo grupo, se describe la síntesis de microfibras compuestas por partículas huecas de carbono o de *composites* de carbono y óxidos metálicos (de ZrO_2 , TiO_2 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, entre otros), siempre empleando el mismo proceso criogénico y unidireccional de síntesis.¹²¹ Una buena dispersión de óxidos metálicos con actividad catalítica o actividad redox en un soporte de carbono con gran área superficial podría ser útil para mejorar el rendimiento de los procesos catalíticos o la respuesta de los capacitores electroquímicos.

En unos trabajos del grupo de Cooper se describen distintas estructuras complejas a partir de polímeros, nanopartículas, o mezclas de ambos. Entre sus logros se cuenta la preparación de nanocomposites polimérico-inorgánicos, microfibras porosas, composites de redes alineadas en dos direcciones, microhilos y microrredes de oro,¹²²⁻¹²³ e incluso microesferas de α -quimotripsina con diferentes mezclas poliméricas.¹²⁴ En un trabajo más reciente de este mismo grupo se describe la síntesis de micropartículas de poli ϵ -caprolactona con porosidad alineada en una dirección, que forman parte de un composite polimérico, también de porosidad alineada (Fig. 1.17). Este trabajo demuestra la versatilidad del método como ruta genérica para preparar micropartículas porosas de porosidad controlada. Como demostración de las posibles aplicaciones de estas microestructuras, se utilizan las micropartículas de poli ϵ -caprolactona como soporte para el crecimiento de células embrionarias de ratón.¹²⁵

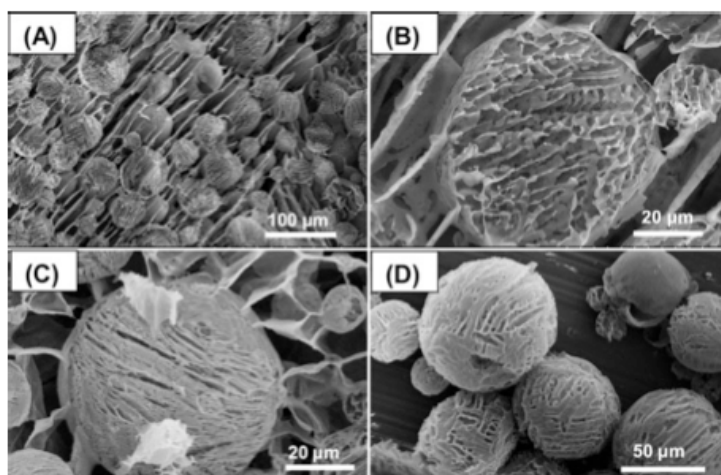


Figura 1.17. Partículas de poli ϵ -caprolactona con porosidad alineada incluidas en una matriz polimérica de PVA y SDS (A). Morfología interna (B) y de la superficie externa (C) de una de estas partículas. Partículas liberadas tras la disolución de la matriz polimérica.¹²⁵

Una de las grandes ventajas del proceso de moldeado en hielo es su biocompatibilidad, dada por la posibilidad de utilizar como material de partida suspensiones o dispersiones acuosas de diversa naturaleza y la ausencia de reacciones químicas u otros procesos de purificación

adicionales. Se evitan así todos los inconvenientes asociados a la presencia de subproductos de reacción, a los procesos de eliminación de los moldes y al uso de altas temperaturas o disolventes agresivos. Por todo ello, resulta una metodología ideal para el desarrollo de soportes 3D porosos para su aplicación en Ingeniería de tejidos, como demuestran los diferentes trabajos publicados hasta la fecha. En este ámbito, caben destacar dos trabajos publicados por el grupo de Tomsia. El primero, describe la preparación de soportes que imitan no sólo la composición, sino también la estructura natural del hueso. Preparados a partir de una mezcla de un componente cerámico (hidroxiapatita) y resina polimérica, los *scaffolds* obtenidos resultan ultraligeros, con buenas propiedades mecánicas, y con una estructura que imita a la del nácar (Fig. 1.18). Gracias a su naturaleza híbrida y a su morfología estos biomateriales exhiben unos valores de rigidez (10 GPa), tensión compresiva (150 MPa) y energía de fractura (220 J/m²), similares a los del hueso, y con una composición equivalente en cuanto a la proporción entre el contenido mineral y orgánico.¹²⁶ En un trabajo posterior, este mismo grupo describe la preparación de *composites* híbridos de alúmina y polimetilmetacrilato, que muestran una tenacidad hasta 300 veces mayor que sus componentes por separado, y con unas propiedades de resistencia a la fractura y un límite elástico similares a las de una aleación de aluminio.¹²⁷

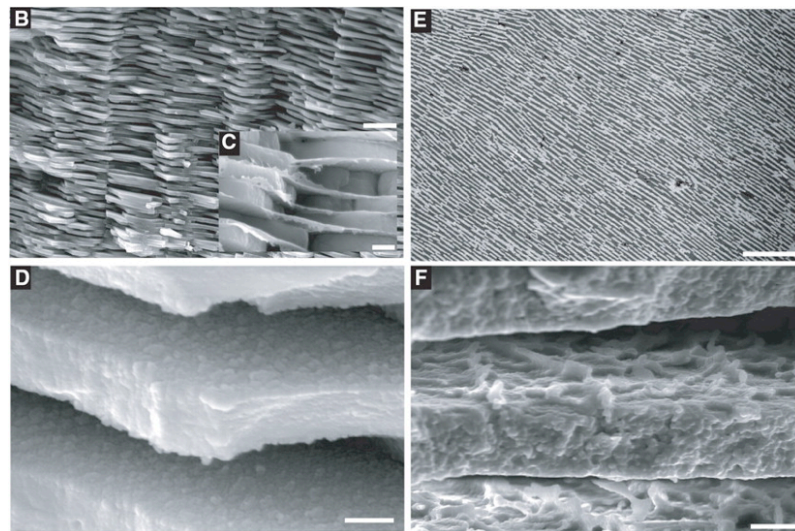


Figura 1.18. Micrografías de SEM de nácar natural (B,C y D) y de composites de hidroxiapatita preparados por moldeado de hielo (E y F) mostrando la similitud entre ambas estructuras. Las barras de escala son: 5 (B); 0.5 (C); 0.3 (D), 300 (E) y 10 μ m (F).¹²⁶

En nuestro grupo se han preparado *scaffolds* híbridos de nanotubos de carbono y quitosano, sobre los que se ha embebido de una proteína morfogenética (rhBMP-2) demostrando, mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*, la biocompatibilidad y la capacidad de regeneración

tisular en presencia del soporte. Además, se han preparado criogeles poliméricos, tanto de PVA¹¹³ como de quitosano,¹²⁸ con microcristales de un antibiótico (ciprofloxacino) embebidos en su estructura, en los cuales, la cinética de liberación del antibiótico es dependiente de la morfología del *scaffold*. La biocompatibilidad del proceso criogénico ISISA posibilita, incluso, la preparación de materiales biohíbridos. Las soluciones acuosas de partida proporcionan un ambiente adecuado para que entidades con una estructura compleja, como micelas, vesículas con estructura de membrana o proteínas, puedan permanecer estables y conservar la funcionalidad que les confiere su organización. El proceso criogénico ISISA permite preservar esa organización, generando criogeles biohíbridos con gran nivel de complejidad. Por ejemplo, aplicando la metodología ISISA a una suspensión orgánico/inorgánica de sílice/PVA en la cual se había disuelto previamente un enzima (PLE, esterasa de hígado de cerdo) se observa cómo ésta conserva su estructura y actividad dentro del *scaffold* obtenido.¹²⁹ Esto es posible gracias a la sofisticada organización estructural obtenida en estos monolitos, con el enzima envuelto en nanodominios de PVA que, a su vez quedaban embebidos en la estructura macroporosa de sílice. De este modo, se impide la interacción del enzima con los grupos silanoles de la sílice y, por consiguiente, se evita la desnaturalización de la misma.

El mantenimiento de la integridad estructural de las entidades biológicas durante el proceso criogénico también se ha conseguido en un sistema coloidal binario de liposomas en hidrogeles de sílice.¹³⁰ Las paredes de sílice actúan como agentes crioprotectores, cuando las estructuras de membrana quedan totalmente embebidas en las paredes del monolito. De no ser así, la formación de hielo cristalino provocaría la ruptura de las membranas lipídicas.¹³¹

Mediante un sistema adicional de crioprotección, también se ha logrado la colonización *in situ* de criogeles de PVA con un cultivo de *E. coli*. En este caso, en lugar de dispersar directamente el inóculo bacteriano en la disolución de PVA, éste se inmoviliza previamente en microesferas de alginato de calcio en estado gel.¹³² De esta forma las bacterias que por su tamaño sobrepasan el de las paredes del *scaffold* y, por tanto, quedarían desprotegidas de la acción crioprotectora de sus paredes, sobreviven al proceso criogénico en las microesferas y colonizan posteriormente la estructura 3D, desde el interior hacia el exterior, en el sentido en que aumenta la concentración de nutrientes.

En conclusión, la metodología ISISA es una herramienta muy útil para la preparación de materiales funcionales y jerárquicos (con diferentes niveles de organización espacial) que puedan ser utilizados en una gran variedad de aplicaciones.

1.3. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ D.F. Williams D. F., "Definitions in Biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials (Chester, England, March 3-5)" Ed: Elsevier, New York, v.4 (1986).
- ² II Consensus Conference on Definitions in Biomaterials, "In: Biomaterial-Tissue Interface: Advances in Biomaterials" Ed: Elsevier Science, Amsterdam (1991) pp. 525-533.
- ³ F.J. Monteiro, J. San Román, "Biomaterials: Introducción y desarrollo histórico. In: Biomateriales" *CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*, pp. 17-26.
- ⁴ R. Langer, J.P. Vacanti, "Tissue engineering" *Science* 260 (1993) 920-926.
- ⁵ C.W. Patrick, A.G. Mikos, L.V. McIntire, "Prospects of tissue engineering. In: Frontiers in Tissue Engineering" Ed: Elsevier Science Ltd., Oxford, (1998) pp. 3-11.
- ⁶ G.E. Rutkowski, "Engineered tissue-Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, Second Edition" John Wiley & Sons, Inc. (2006).
- ⁷ K.Y. Lee, D.J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering" *Chemical Reviews* 101 (2001) 1869-1879.
- ⁸ J. Lee, M.J. Cuddhy, N.A. Kotov, "Three-dimensional cell culture matrices: state of the art" *Tissue Engineering: Part B* 14 (2008) 61-86.
- ⁹ R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, "Principles of Tissue Engineering" Elsevier Academic Press, London (2007).
- ¹⁰ C. Sanchez, H. Arribart, M.M.G. Guille, "Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems" *Nature Materials* 4 (2005) 277-288.
- ¹¹ Y. Bar-Cohen, "Biomimetics-Using nature to inspire human innovation" *Bioinspiration and Biomimetics* 1 (2006) P1-P12.
- ¹² J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone" *Medical Engineering & Physics* 20 (1998) 92-102.
- ¹³ S.J. Hollister, R.A. Levy, T.M. Chu, J.W. Halloran, S.E. Feinberg, "An image-based approach for designing and manufacturing craniofacial scaffolds" *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 29 (2000) 67-71.
- ¹⁴ Y.-Y. Chen, C.-P. Jiang, C.-C. Chen, "Development of bio-rapid prototyping system for fabricating bone scaffold using thermal-sensitive biopolymer" *Advanced Materials Research* 488-489 (2012) 985-990.
- ¹⁵ A.D. Lantada, J.L. Endrino, V.S. Vaquero, A. Mosquera, P. Lafont, J.P. García-Ruiz, "Tissue engineering using novel rapid prototyped diamond-like carbon coated scaffolds" *Plasma Processes and Polymers* 9 (2012) 98-107.
- ¹⁶ L.P. Gartner, J.L. Hiatt, "Color Textbook of Histology" Saunders, Philadelphia (2001)
- ¹⁷ G.F. Muschler, C. Nakamoto, L.G. Griffith, "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering" *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 86 (2004) 1541-1558.
- ¹⁸ C.Y. Lin, N. Kikuchi, S.J. Hollister, "A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity" *Journal of Biomechanics* 37 (2004) 623-636.
- ¹⁹ M.M. Stevens, J.H. George, "Exploring and engineering the cell surface interface" *Science* 310 (2005) 1135-1138.
- ²⁰ J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, "Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers" *Science* 294 (2001) 1684-1688.
- ²¹ S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, "Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles" *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99 (2002) 5355-5360.

- ²² G. Wei, P.X. Ma, "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 25 (2004) 4749-4757.
- ²³ E. Sachlos, D. Gotor, J.T. Czernuszka, "Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain internal microchannels" *Tissue Engineering* 12 (2006) 2479-2487.
- ²⁴ D.W. Hutmacher, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives" *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 12 (2001) 107-124.
- ²⁵ G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, "Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering" *Materials Science and Engineering C* 17 (2001) 63-69.
- ²⁶ C.S. Ranucci, A. Kumar, S.P. Batra, P.V. Moghe, "Control of hepatocyte function on collagen foams: sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis" *Biomaterials* 21 (2000) 783-793.
- ²⁷ L. Tian, S.C. George, "Biomaterials to prevascularize engineered tissues" *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4 (2011) 685-698.
- ²⁸ J.-S. Lee, H.D. Cha, J.-H. Shim, J.W. Jung, J.Y. Kim, D.-W. Cho, "Effect of pore architecture and stacking direction on mechanical properties of solid freeform fabrication-based scaffold for bone tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research-Part A* (2012) Article in press.
- ²⁹ S.-H. Kim, E. Chung, S.-H. Kim, Y. Jung, Y.H. Kim, S.H. Kim, "A novel seamless elastic scaffold for vascular tissue engineering" *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 21 (2010) 289-302.
- ³⁰ F. García-Esteo, G. Pascual, A. Gallardo, J. San-Román, J. Buján, J.M. Bellón, "A biodegradable copolymer for the slow release of growth hormone expedites scarring in diabetic rats" *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 81 (2007) 291-304.
- ³¹ S. Li, "Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids" *Journal of Biomedical Materials Research* 48 (1999) 342-353.
- ³² I.V. Yannas, J.F. Burke, C. Huang, P.L. Gordon, "Correlation of in vivo collagen degradation rate with in vitro measurements" *Journal of Biomedical Materials Research* 9 (1975) 623-628.
- ³³ M.J. Van Amerongen, M.C. Harmsen, A.H. Petersen, G. Kors, M.J.A. Van Luyn, "The enzymatic degradation of scaffolds and their replacement by vascularized extracellular matrix in the murine myocardium" *Biomaterials* 27 (2006) 2247-2257.
- ³⁴ S. Zhang, "Hydrogels: wet or let die" *Nature Materials* 3 (2004) 7-8.
- ³⁵ J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss, "Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds" *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 698-725.
- ³⁶ L.C. Xu, "Effect of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces" *Biomaterials* 28 (2007) 3272-3283.
- ³⁷ J.L. Drury, D.J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications" *Biomaterials* 24 (2003) 4337-4351.
- ³⁸ L.T. Allen, M. Tosetto, I.S. Miller, D.P. O'Connor, S.C. Penney, I. Lynch, A.K. Keenan, S.R. Pennington, K.A. Dawson, W.M. Gallagher, "Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction" *Biomaterials* 27 (2006) 3096-3108.
- ³⁹ Y.M. Chen, N. Shiraishi, H. Satokawa, A. Kakugo, T. Narita, J.P. Gong, Y. Osada, K. Yamamoto, J. Ando, "Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels" *Biomaterials* 26 (2005) 4588-4596.
- ⁴⁰ G.B. Schneider, A. English, M. Abraham, R. Zaharias, C. Stanford, J. Keller, "The effect of hydrogel charge density on cell attachment" *Biomaterials* 25 (2004) 3023-3028.

- ⁴¹ Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N.A. Kotov, "Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering" *Advanced Materials* 18 (2006) 3203-3224.
- ⁴² H.Y. Chen, Y. Elkasabi, J. Lahann, "Surface modification of confined microgeometries via vapor-deposited polymer coatings" *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 374-380.
- ⁴³ R. Ravichandran, S. Sundarajan, J.R. Venugopal, S. Mukherjee, S. Ramakrishna, "Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications" *Macromolecular Bioscience* 12 (2012) 286-311.
- ⁴⁴ J. San Román, "Biopolímeros Sintéticos. In: Biomateriales" *CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*, pp. 89-108.
- ⁴⁵ C.M. Agrawal, R.B. Ray, "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research* 55 (2001) 141-150.
- ⁴⁶ L.G. Griffith, "Polymeric biomaterials" *Acta Materialia* 48 (2000) 263-277.
- ⁴⁷ T. Hayashi, "Biodegradable polymers for biomedical uses" *Progress in Polymer Science* 19 (1994) 662-702.
- ⁴⁸ G.A. Abraham, J.V. Cauich Rodriguez, C. Peniche, A. Gallardo, "Biopolímeros de origen natural. In: Biomateriales" *CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*, pp. 109-128.
- ⁴⁹ A.G. Mikos, G. Sarakinos, S.M. Leite, J.P. Vacanti, R. Langer, "Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering" *Biomaterials* 14 (1993) 323-330.
- ⁵⁰ A.G. Mikos, A.J. Thorsen, L.A. Czerwonka, Y. Bao, R. Langer, "Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams" *Polymer* 35 (1994) 1068-1077.
- ⁵¹ D.J. Mooney, D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, R. Langer, "Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic co-glycolic acid) without the use of organic solvents" *Biomaterials* 17 (1996) 1417-1422.
- ⁵² L.G. Cima, J.P. Vacanti, C. Vacanti, D. Inger, D. Mooney, R. Langer, "Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates" *Journal of Biomechanical Engineering* 113 (1991) 143-151.
- ⁵³ Y.Y. Hsu, J.D. Gresser, D.J. Trantolo, C.M. Lyons, P.R.J. Gangadharam, D.L. Wise, "Effect of polymer foam morphology and density on kinetics of in vitro controlled release of isoniazid from compressed foam matrices" *Journal of Biomedical Materials Research* 35 (1997) 107-116.
- ⁵⁴ I.V. Yannas, J.F. Burke, P.L. Gordon, C. Huang, R.H. Rubenstein, "Design of an artificial skin. Part II. Control of chemical composition" *Biomaterials* 14 (1980) 107-131.
- ⁵⁵ N. Dagalakakis, J. Flink, P. Stasikelis, J.F. Burke, I.V. Yannas, "Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure" *Biomaterials* 14 (1980) 511-528.
- ⁵⁶ C.J. Doillon, C.F. Whyne, S. Brandwein, F.H. Silver, "Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology" *Journal of Biomedical Materials Research* 20 (1986) 1219-1228.
- ⁵⁷ S. Sekou, S. Zhong, Z. Sun, "The use of rapid prototyping to fabricate liver tissue engineering scaffold" *Advanced Materials Research* 328-330 (2011) 658-661.
- ⁵⁸ H.D.A. Almeida, P.J. da Silva Bártolo, "Virtual topological optimisation of scaffolds for rapid prototyping" *Medical Engineering and Physics* 32 (2010) 775-782.
- ⁵⁹ L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, "Culture of organized cell communities" *Advanced Drug Delivery Reviews* 33 (1998) 15-30.
- ⁶⁰ J.J. Mercuri, D.T. Simionescu, "Advances in tissue engineering approaches to treatment of intervertebral disc degeneration: Cells and polymeric scaffolds for nucleus pulposus regeneration" *Advances in Polymer Science* 247 (2012) 201-231.

- ⁶¹ A.M. Reed, D.K. Gilding, "Biodegradable polymer for use in surgery-poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation" *Polymer* 22 (1981) 494-498.
- ⁶² M. Vert, J. Mauduit, S. Li, "Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity" *Biomaterials* 15 (1994) 1209-1213.
- ⁶³ D.G. Kohn, M. Sarmadi, J.I. Helman, P.H. Krebsbach, "Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone" *Journal of Biomedical Materials Research* 60 (2002) 292-299.
- ⁶⁴ M.C. Wake, P.D. Gerecht, L.C. Lu, A.G. Mikos, "Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived stromal osteoblasts in vitro" *Biomaterials* 19 (1998) 1255-1268.
- ⁶⁵ J.E. Bergsma, W.C. de Bruijn, F.R. Rozema, R.R. Bos, G. Boering, "Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws" *Biomaterials* 16 (1995) 25-31.
- ⁶⁶ J. Suganuma, H. Alexander, "Biological response of intramedullary bone to poly-L-lactic acid" *Journal of Applied Biomaterials* 4 (1993) 13-27.
- ⁶⁷ B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, "Molecular Biology of the Cell, 3rd edition" Garland Publishing Ltd, New York (1994), pp 971-1000.
- ⁶⁸ H.K. Kleinman, R.J. Klebe, G.R. Martin, "Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells" *The Journal of Cell Biology* 88 (1981) 473-485.
- ⁶⁹ A. Arem, "Collagen modifications" *Clinics in Plastic Surgery* 12 (1985) 209-220.
- ⁷⁰ I.V. Yannas, E. lee, D.P. Orgill, E.M. Skrabut, G.F. Murphy, "Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989) 933-937.
- ⁷¹ A. Atala, S.B. bauer, S. Soker, J.J. Yoo, A.B. Retik, "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty" *The Lancet* 367 (2006) 1241-1246.
- ⁷² P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M.A. Asnaghi, L.E. Rees, T.A. Cogan, A. dodson, J. Martorell S. Bellini, P.P. Parnigotto, S.C. Dickinson, A.P. Hollander, S. Mantero, M.T. Conconi, M.A. Birchall, "Clinical transplantation of a tissue-engineered airway" *The Lancet* 372 (2008) 2023-2030.
- ⁷³ R. Schimming, R. Schmelzeisen, "Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation" *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 62 (2004) 724-729.
- ⁷⁴ P.H. Warnke, I.N.G. Springer, J. Wiltfang, Y. Acil, H. Eufinger, M. Wehmöller, P.A.J. Russo, H. Bolte, E. Sherry, E. Behrens, H. Terheyden, "Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man" *The Lancet* 364 (2004) 766-770.
- ⁷⁵ M.J. Lysaght, A. jaklenec, E. Deweerd, "Great expectations: Private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics" *Tissue Engineering-Part A* 14 (2008) 305-315.
- ⁷⁶ J.P. Vacanti, "Editorial: Tissue engineering: A 20-year personal perspective" *Tissue Engineering* 13 (2007) 231-232.
- ⁷⁷ R.M. Nerem, "Tissue engineering: The hope, the hype, and the future" *Tissue Engineering* 12 (2006) 1143-1150.
- ⁷⁸ M. Lovett, K. Lee, A. Edwards, D.L. Kaplan, "Vascularization strategies for tissue engineering" *Tissue Engineering-Part B:Reviews* 15 (2009) 353-370.
- ⁷⁹ E.S. Place, N.D. Evans, M.M. Stevens, "Complexity on biomaterials for tissue engineering" *Nature Materials* 8 (2009) 457-470.
- ⁸⁰ J. Atance, M.J. Yost, W. Carver, "Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch" *Journal of Cellular Physiology* 200 (2004) 377-386.

- ⁸¹ C.B. Khatiwala, S.R. Peyton, A.J. Putnam, “Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 290 (2006) C1640-C1650.
- ⁸² D.E. Discher, D.J. Mooney, P.W. Zandstra, “Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells” *Science* 324 (2009) 1673-1677.
- ⁸³ A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, “Matrix elasticity directs stem cell lineage specification” *Cell* 126 (2006) 677-689.
- ⁸⁴ K. Saha, A.J. Keung, E.F. Irwin, Y. Li, L. Little, D.V. Schaffer, K.E. Healy, “Substrate modulus directs neural stem cell behavior” *Biophysical Journal* 95 (2008) 4426-4438.
- ⁸⁵ I.R. Dégano, L. Quintana, M. Vilalta, D. Horna, N. Rubio, S. Borrós, C. Semino, J. Blanco, “The effect of self-assembling peptide nanofiber scaffolds on mouse embryonic fibroblast implantation and proliferation” *Biomaterials* 30 (2009) 1156-1165.
- ⁸⁶ J.L. Young, A.J. Engler, “Hydrogels with time-dependent material properties enhance cardiomyocyte differentiation in vitro” *Biomaterials* 32 (2011) 1002-1009.
- ⁸⁷ P. Tayalia, D.J. Mooney, “Controlled growth factor delivery for tissue engineering” *Advanced Materials* 21 (2009) 3269-3285.
- ⁸⁸ M. C. Meikle, “On the transplantation, regeneration and induction of bone: The path to bone morphogenetic proteins and other skeletal growth factors” *Surgeon* 5 (2007) 232-243.
- ⁸⁹ D. Huang, Y. Zuo, Q. Zuo, L. Zhang, J. Li, L. Cheng, J. Shen, Y. Li, “Antibacterial chitosan coating on nano-hydroxyapatite/polyamide66 porous bone scaffold for drug delivery” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 22 (2010) 931-944.
- ⁹⁰ R.M. Capito, M. Spector, “Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering” *Gene Therapy* 14 (2007) 721-732.
- ⁹¹ I.O. Smith, X. Liu, L.A. Smith, P.X. Ma, “Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine” *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1 (2009) 226-236.
- ⁹² J.M. Wozney, V. Rosen, “Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair” *Clinical Orthopaedics and Related Research* 346 (1998) 26-37.
- ⁹³ J. Bonadio, E. Smiley, P. patil, S. Goldstein, “Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: Prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration” *Nature Medicine* 5 (1999) 753-759.
- ⁹⁴ M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, F. del Monte, “Ice-templated materials: sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly” *Chemistry of Materials* 20 (2008) 634-648.
- ⁹⁵ M.C. Gutiérrez, M. Jobbágy, N. Rapún, M.L. Ferrer, F. del Monte, “A biocompatible bottom-up route for the preparation of hierarchical biohybrid materials” *Advanced Materials* 18 (2006) 1137-1140.
- ⁹⁶ S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, “Ice-templated porous alumina structures” *Acta Materialia* 55 (2007) 1965-1974.
- ⁹⁷ W.F. Daamen, H.B. Van Moerkerk, T. Hafmans, L. Buttafoco, A.A. Poot, J.H. Veerkamp, T. H. Van Kuppevelt, “Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering” *Biomaterials* 24 (2003) 4001-4009.
- ⁹⁸ N. Dagalakakis, J. Flink, P. Stasikelis, “Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure” *Journal of Biomedical Materials Research* 14 (1980) 511-528.
- ⁹⁹ C.Y. Hsieh, S.P. Tsai, D.M. Wang, Y.N. Chang, H.J. Hsieh, “Preparation of γ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices” *Biomaterials* 26 (2005) 5617-5623.

- ¹⁰⁰ M.-H. Ho, D.-M. Wang, C.-E. Liu, C.-H. Hsieh, H.-C. Tseng, H.-J. Hsieh, "Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds" *Carbohydrate Polymers* 67 (2007) 124-132.
- ¹⁰¹ M.-H. Ho, P.-Y. Kuo, H.-J. Hsieh, T.-Y. Hsien, L.-T. Hou, J.-Y. Lai, D.-M. Wang, "Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods" *Biomaterials* 25 (2004) 129-138.
- ¹⁰² G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, "Preparation of poly (L-lactic acid) and poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticulates" *Biomaterials* 22 (2001) 2563-2567.
- ¹⁰³ W.S.W. Shalaby, G.E. Peck, K. Park, K. "Release of dextromethorphan hydrobromide from freeze-dried enzyme-degradable hydrogels" *J Control Release* 16 (1991) 355-363.
- ¹⁰⁴ W. Mahler, M.F. Bechtold, "Freeze-formed silica fibres" *Nature* 285 (1980) 27-28.
- ¹⁰⁵ T. Fukasawa, M. Ando, T. Ohji, S. Kanzaki, "Synthesis of Porous Ceramics with Complex Pore Structure by Freeze-Dry Processing" *Journal of American Ceramic Society* 84 (2001) 230-232.
- ¹⁰⁶ H. Nishihara, S.R. Mukai, D. Yamashita, H. Tamon, "Ordered macroporous silica by ice templating" *Chemistry of Materials* 17 (2005) 683-689.
- ¹⁰⁷ S.R. Mukai, H. Nishihara, H. Tamon, "Preparation of resorcinol-formaldehyde carbon cryogel microhoneycombs" *Carbon* 42 (2004) 899-901.
- ¹⁰⁸ S.R. Mukai, H. Nishihara, H. Tamon, "Formation of monolithic silica gel microhoneycombs (SMHs) using pseudosteady state growth of microstructural ice crystals" *Chemical Communications* 10 (2004) 874-875.
- ¹⁰⁹ S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 27 (2006) 5480-5489.
- ¹¹⁰ E. Mayer, "New method for vitrifying water and other liquids by rapid cooling of their aerosols" *Journal of Applied Physics* 58 (1985) 663-667.
- ¹¹¹ M.C. Gutiérrez, Z. García-Carvajal, M. Jobbagy, F. Rubio, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies for drug delivery and controlled release" *Advanced Functional Materials* 17 (2007) 3505-3513
- ¹¹² H. Zhang, I. Hussain, M. Brust, M.F. Butler, S.P. Rannard, A.I. Cooper, "Aligned two- and three- dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles" *Nature Materials* 4 (2005) 787-793.
- ¹¹³ M.C. Gutiérrez, Z. García-Carvajal, M. Jobbagy, F. Rubio, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies for drug delivery and controlled release" *Advanced Functional Materials* 17 (2007) 3505-3513.
- ¹¹⁴ H.-W. Kang, Y. Tabata, Y. Ikada, "Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering" *Biomaterials* 20 (1999) 1339-1344.
- ¹¹⁵ T. Fukasawa, Z.-Y. Deng, M. Ando, T. Ohji, Y. Goto, "Pore structure of porous ceramics synthesized from water-based slurry by freeze-dry process" *Journal of Materials Science* 36 (2001) 2523-2527.
- ¹¹⁶ H. Nishihara, S.R. Mukai, Y. Fujii, T. Tago, T. Masuda, H. Tamon, "Preparation of monolithic SiO₂-Al₂O₃ cryogels with inter-connected macropores through ice templating" *Journal of Materials Chemistry* 31 (2006) 3231-3236.
- ¹¹⁷ S.R. Mukai, H. Nishihara, S. Shichi, H. Tamon, H. "Preparation of porous TiO₂ cryogel fibers through unidirectional freezing of hydrogel followed by freeze-drying" *Chemistry of Materials* 16 (2004) 4987-4991.
- ¹¹⁸ H. Nishihara, S.R. Mukai, H. Tamon, "Preparation of resorcinol-formaldehyde carbon cryogel microhoneycombs" *Carbon* 42 (2004) 899-901.
- ¹¹⁹ S.R. Mukai, H. Nishihara, T. Yoshida, K. Taniguchi, H. Tamon, "Morphology of resorcinol-formaldehyde gels obtained through ice-templating" *Carbon* 43 (2005) 1563-1565.

- ¹²⁰ Q. Shi, Z. An, C.-K. Tsung, H. Liang, N. Zheng, C.J. Hawker, G.D. Stucky, "Ice-templating of core/shell microgel fibers through 'Bricks-and-Mortar' assembly" *Advanced Materials* 19 (2007) 4539-4543.
- ¹²¹ Q. Shi, H. Liang, D. feng, J. Wang, G.D. Stucky, "Porous carbon and carbon/metal oxide microfibers with well-controlled pore structure and interface" *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008) 5034-5035.
- ¹²² H. Zhang, I. Hussain, M. Brust, M.F. Butler, S.P. Rannard, A.I. Cooper, A. I. "Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles" *Nature Materials* 4 (2005) 787-793.
- ¹²³ H. Zhang, J.-Y. Lee, A. Ahmed, I. Hussain, A.I. Cooper, "Freeze-align and heat-fuse: Microwires and networks from nanoparticle suspensions" *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) 4573-4576.
- ¹²⁴ J. Long, G.A. Hutcheon, A.I. Cooper, "Combinatorial discovery of reusable noncovalent supports for enzyme immobilization and nonaqueous catalysis" *Journal of Combinatorial Chemistry* 9 (2007) 399-406.
- ¹²⁵ H. Zhang, D. Edgar, P. Murray, A. Rak-Raszewska, L. Glennon-Alty, A.I. Cooper, "Synthesis of Porous Microparticles with Aligned Porosity" *Advanced Functional Materials* 18 (2008) 222-228.
- ¹²⁶ S. Deville, E. Saiz, R.K. Nalla, A.P. Tomsia, "Freezing as a Path to Build Complex Composites" *Science* 311 (2006) 515-518.
- ¹²⁷ E. Munch, M.E. Launey, D.H. Alsem, E. Saiz, A.P. Tomsia, R.O. Ritchie, "Tough, bioinspired hybrid materials" *Science* 322 (2008) 1516-1520.
- ¹²⁸ I. Aranaz, M.C. Gutiérrez, L. Yuste, F. Rojo, M.L. Ferrer, F. del Monte, F. "Controlled formation of the anhydrous polymorph of ciprofloxacin crystals embedded within chitosan scaffolds: Study of the kinetic release dependence on crystal size" *Journal of Materials Chemistry* 19 (2009) 1576-1582.
- ¹²⁹ M.C. Gutiérrez, M. Jobbagy, N. Rapun, M.L. Ferrer, F. del Monte, F. "A biocompatible bottom-up route for the preparation of hierarchical biohybrid materials" *Advanced Materials* 18 (2006) 1137-1140.
- ¹³⁰ M.L. Ferrer, R. Esquembre, I. Ortega, C.R. Mateo, F. del Monte, F. "Freezing of binary colloidal systems for the formation of hierarchy assemblies" *Chemistry of Materials* 18 (2006) 554-559.
- ¹³¹ U. Soltmann, H. Böttcher, D. Koch, G. Grathwohl, "Freeze gelation: a new option for the production of biological ceramic composites (biocers)" *Materials Letters* 57 (2003) 2861-2865.
- ¹³² M.C. Gutierrez, Z.-Y. Garcia-Carvajal, M. Jobbagy, L. Yuste, F. Rojo, C. Abrusci, F. Catalina, F. Monte, M.L. Ferrer, "Hydrogel scaffolds with immobilized bacteria for 3D cultures" *Chemistry of Materials* 19 (2007) 1968-1973.

II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En esta memoria, se busca aplicar la metodología ISISA (*ice segregation induced self-assembly*), desarrollada en el grupo, en la preparación de los *scaffolds*, que una vez fabricados se caracterizan, y evalúan, como sistemas de liberación de sustancias biológicamente activas, o como soportes que estimulen la regeneración de tejido.

En el caso de la regeneración de tejido óseo, el objetivo es preparar *scaffolds* que induzcan la formación de hidroxiapatita y colágeno, principales componentes de tejido óseo. Para ello, se busca incorporar en *scaffolds* de quitosano precursores de hidroxiapatita y además, una proteína morfogenética, tipo rhBMP-2, caracterizada por su alta capacidad oseoinductora. Se busca además, potenciar el carácter multifuncional de este tipo de *scaffolds* mediante la incorporación de un fármaco en el propio soporte. Así, en el caso de que, como consecuencia de la implantación quirúrgica del soporte se produzca una infección, el fármaco puede ser liberado de manera controlada.

Por otro lado, la incorporación de nanotubos de carbono en los soportes, proporciona conductividad, y permite mejorar sus propiedades mecánicas. En la segunda parte de la tesis, se prepararán *scaffolds*, con distintos tipos de nanotubos de carbono, y polímeros dispersantes (quitosano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, gelatina y elastina). Mediante la modificación de las condiciones de síntesis, se pretende modular propiedades químicas superficiales de los soportes, así como las variables que afectan la metodología ISISA para obtener un mayor control de la porosidad. Una vez obtenidos los diferentes *scaffolds*, se propone evaluar su biocompatibilidad *in vitro* con diferentes tipos celulares (fibroblastos L929, osteoblastos Saos-2 y células endoteliales EC_{PC}). Por último, sobre un *scaffold* conductor seleccionado como electrodo, y tras desarrollar una metodología de trabajo en flujo a través de los soportes (que posibilite, incluso, la colonización celular en los soportes 3D), se pretende realizar un recubrimiento *a posteriori* de fosfato de calcio (mediante electrodeposición) para tratar de promover la formación de tejido óseo en presencia de osteoblastos.

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. PRINCIPALES MATERIALES EMPLEADOS

3.1.1. MATERIALES PARA LA FABRICACIÓN DEL SOPORTE

3.1.1.1. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNTs) son una de las formas alotrópicas del carbono, junto con el grafito, el carbón amorfo, el diamante, el diamante hexagonal y los fullerenos.¹ La estructura de un nanotubo de carbono en su forma más perfecta consta de redes hexagonales de átomos de carbono con hibridación sp^2 que se enrollan para generar un cilindro hueco. En algunos casos, los extremos de esta estructura cilíndrica pueden quedar recubiertos por media molécula de fullereno. El fullereno es una forma alotrópica del carbono con hibridación intermedia entre sp^2 y sp^3 , lo que hace posible que los átomos de carbono se combinen formando hexágonos y pentágonos dando lugar a estructuras esféricas cerradas.²⁻³

Dentro de los CNTs están incluidos varios tipos de estructuras: de pared simple (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs), doble (*double-walled carbon nanotubes*, DWCNTs), o múltiple (*multi-walled carbon nanotubes*, MWCNTs). Los primeros pueden describirse como cilindros formados cuando láminas aisladas de grafeno se enrollan sobre sí mismas, con diámetros entre 1 y 2 nm.⁴⁻⁵ En el caso de los DWCNTs, son dos láminas las que se piegan en torno a un eje.⁶ Los MWCNTs consisten en una lámina de grafito (una pila de láminas de grafeno) enrollada en cilindros concéntricos, con espacio de 0.3-0.4 nm entre las capas. Generalmente se utilizan tres métodos para la preparación de CNTs: descarga por arco eléctrico, ablación laser, o deposición química en fase de vapor (*chemical vapor deposition*, CVD). Las dos primeras permiten obtener CNTs de alta pureza, aunque en pequeña cantidad. La técnica más usada comercialmente es CVD, ya que permite la obtención de mayores cantidades de CNTs.⁷⁻⁸

En los experimentos descritos en esta memoria se utilizan MWCNTs con un diámetro de ~100 nm, y una longitud 5-9 μm , con más de un 90% de pureza, comprado de Sigma-Aldrich. En todo los casos, los MWCNTs se someten a un tratamiento en medio ácido previamente a ser utilizados. Este tratamiento tiene la finalidad de eliminar las impurezas procedentes de su síntesis y de funcionalizar sus paredes mediante la generación de grupos funcionales con oxígenos en sus extremos y, en zonas de sus paredes, de defectos en la estructura de hexágonos de C.

3.1.1.2. Polisacáridos

3.1.1.2.1. Quitosano

El quitosano (Q) es un heteropolisacárido lineal formado por unidades de N-acetil-D-glucos-2-amina y D-glucos-2-amina unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) (Fig. 3.1), que se obtiene por desacetilación alcalina de la quitina. La quitina es el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y se encuentra principalmente en exoesqueletos de artrópodos (arácnidos, insectos y crustáceos) y en la pared celular de algunos hongos.⁹

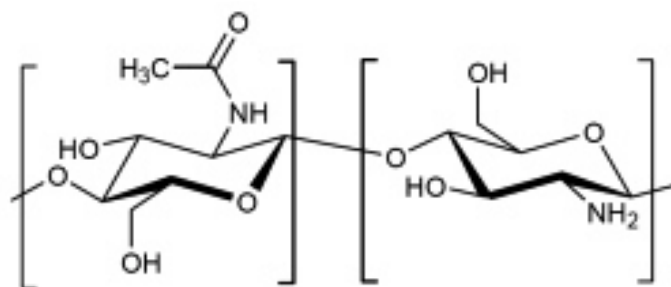


Figura 3.1. Estructura química de la unidad disacáridica del quitosano.

El quitosano es un polímero biodegradable, biocompatible y con un bajo nivel de toxicidad.¹⁰ Es relativamente insoluble en agua y soluble en medio acuoso ácido, dependiendo de su grado de desacetilación y del pH del medio. Su pKa tiene valores alrededor de 6,5 por lo que los grupos amino se encuentran cargados positivamente en medio ácido.¹¹ Siendo un polielectrolito catiónico, el quitosano puede formar complejos electrostáticos con especies cargadas negativamente. Además cuenta con grupos aminos e hidroxilos (primarios y secundarios) como grupos funcionales reactivos susceptibles de sufrir modificaciones químicas. Estas características proporcionan al quitosano excelentes propiedades para formar hidrogeles, químicos o físicos.¹² En los últimos años tanto el quitosano como la quitina han mostrado una gran variedad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica. Además, se han utilizado en el tratamiento de aguas residuales, en agricultura y en cosmética.¹³ También ha suscitado gran interés en el campo de la biomedicina, como sistema de liberación controlada y en la preparación de *scaffolds* en ingeniería de tejidos, entre otras aplicaciones.¹⁴

Los trabajos realizados en esta memoria se llevan a cabo empleando un quitosano de bajo peso molecular proporcionado por Sigma Aldrich (Batch#06513AE, Av. Mol. Wt. 617 KDa, grado de deacetilación (DD) 88 ± 2).

3.1.1.2.2. Sulfato de condroitina

El sulfato de condroitina (o condroitín sulfato, CS) es un polisacárido de longitud variable, caracterizado por una unidad disacáridica que se repite, resultado del enlace entre N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) sulfatada y ácido D-glucorónico (GlcA), con alternancia regular entre los enlaces glicosídicos (1→3) y (1→4) (Fig. 3.2).

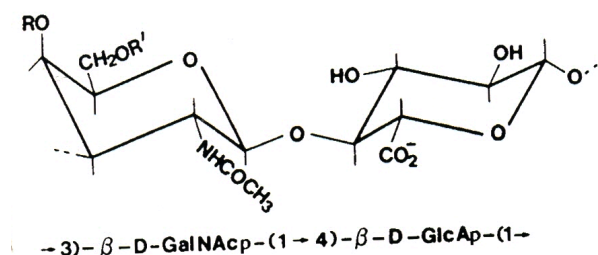


Figura 3.2. Estructura primaria de condroitín: 4-sulfato ($R=SO_3^-$; $R'=H$) o 6-sulfato ($R=H$; $R'=SO_3^-$).

Se habla de una mezcla de condroitín 4,6-sulfato por la presencia de un grupo sulfato en posición 4 o 6 en el residuo GalNAc, dependientemente de la especie y/o de los tejidos de origen. El CS obtenido de animales terrestres (bovinos o cerdos) presenta una mayor cantidad de grupos sulfatados en posición 4, al revés el CS obtenido del cartilago de los tiburones presenta una mayor cantidad de estos grupos en posición 6.¹⁵⁻¹⁶

En los organismos, el CS se encuentra unido covalentemente a una cadena polipeptídica formando los proteoglicanos. Los proteoglicanos se encuentran unidos a la membrana celular en contacto con la matriz extracelular y actúan como moduladores de señales en procesos de comunicación entre la célula y su entorno. También juegan un papel esencial en las funciones y en la elasticidad del cartilago articular.¹⁷ Se ha visto que en los mamíferos, el CS de los huesos y de los cuernos de animales adultos presenta el grupo sulfato en posición 4, mientras que el CS de los tendones y del cartilago, mezclado con el colágeno, presenta el mismo residuo en posición 6. La elevada viscosidad del CS, asociada con su baja compresibilidad, hacen de este glicosaminoglicano una molécula ideal como fluido lubricante en las articulaciones.¹⁸ Actualmente, el CS se usa en el tratamiento de las enfermedades crónicas, como la osteoartritis degenerativa.¹⁹⁻²⁰ Aunque los estudios de absorción intestinal de CS son controvertidos, a causa del elevado peso molecular y la elevada densidad de carga, su suministro vía oral se ha eficaz tanto en humanos como en animales.²¹ Por ello, el número de productos farmacéuticos conteniendo CS ha aumentado notablemente en los últimos años, e incluye formulaciones como cápsulas, pastillas, disoluciones oftalmológicas y preparaciones líquidas.

Los trabajos realizados en esta memoria se llevan a cabo empleando condroitín 4-sulfato proporcionado por Biochemika (Batch#STBB3576, obtenido de tráquea bovina).

3.1.1.2.3. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un polímero lineal de altísimo peso molecular, caracterizado por una unidad disacáridica que se repite, resultado del enlace entre N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y ácido D-glucurónico (GlcA), mediante enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4) (Fig. 3.3).²²⁻²³

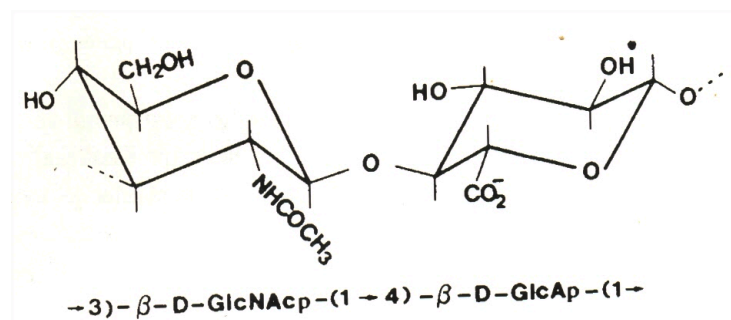


Figura 3.3. Estructura primaria de HA.

El polímero tiene una conformación estable por la presencia de una red de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos carboxílicos, acetamídicos y oxidrílicos, que se encuentran en los dos lados de la cadena y que permiten una elevada rigidez (Fig. 3.4). En disolución las cadenas presentan una estructura tipo *random coil*. El volumen baja al aumentar de la fuerza iónica y del pH, por la naturaleza polielectrolítica del polímero.²⁴⁻²⁵⁻²⁶

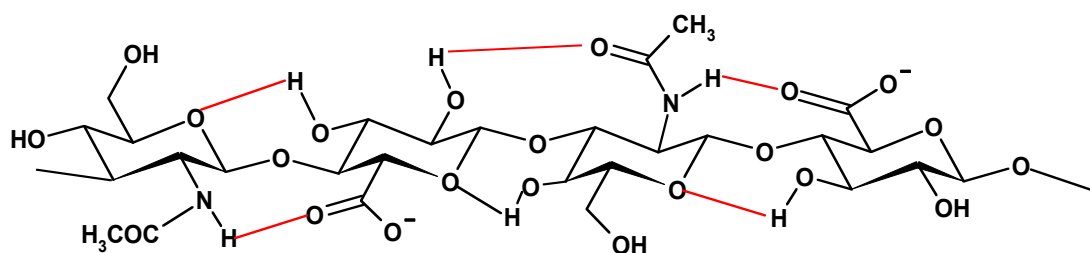


Figura 3.4. Tetramero de HA donde se evidencian los enlaces hidrógeno intermoleculares.

El HA está presente en cantidad variable en fluidos y tejidos animales, y es muy abundante en la matriz extracelular de los tejidos embrionales.²⁷ Es un componente esencial en la fracción no proteica de la matriz extracelular, sobre todo en el cartilago articular y en el derma, un elemento con complicadas estructuras proteoglicánicas responsables de las propiedades

mecánicas y elásticas de los tejidos.²⁸⁻²⁹ Además de las funciones estructurales, el HA es capaz de interactuar directamente con distintos tipos de células a través del enlace específico con receptores de membrana. Esta interacción permite la modulación del número de células involucradas en diferentes procesos biológicos, como la morfogénesis del periodo embrional, el movimiento celular, la angiogénesis, la diferenciación y la reparación tisular.³⁰⁻³¹⁻³² Además, en los últimos años se ha reconocido el complejo papel que este polímero desarrolla en situaciones patológicas mediante su participación en procesos fundamentales como la atracción de fibroblastos, de macrófagos y de células endoteliales.³³ Otra propiedad importante de HA es la capacidad de proteger de los daños de los radicales oxigenados, tipo peróxido o superóxido, durante los procesos de inflamación que se desarrollan junto con las lesiones tisulares, incluidas las cutáneas.³⁴ Originariamente se extraía HA, con elevado grado de pureza, del cordón umbilical y de las crestas de gallos, actualmente se produce en grandes cantidades a través de la fermentación de cultivos de bacterias *Streptococcus*.³⁵ Gracias a sus propiedades químico-físicas, a su importancia en la regulación de las funciones celulares y a su elevada biocompatibilidad, el HA se usa en la preparación de numerosos productos de uso estético y médico (quirurgia ortopédica, la oftalmología, la cura de las heridas).³⁶

Los trabajos realizados en esta memoria se llevan a cabo empleando HA proporcionado por Sigma Aldrich (Batch#1317836-43007120 obtenido de *Streptococcus equi* sp.).

3.1.1.3. Proteínas

3.1.1.3.1. Gelatina

La gelatina (G) es una mezcla heterogénea de cadenas polipeptídicas de medio o elevado peso molecular, obtenidas mediante hidrólisis parcial del colágeno.³⁷ La transformación de colágeno a gelatina se realiza mediante denaturación y siguiente degradación ácida o básica. En particular, la ebullición del colágeno fibroso determina la denaturación de la triple hélice en cadenas polipeptídicas tipo *random coil*. La siguiente degradación, hecha en condiciones distintas, permite obtener dos diversos tipos de gelatina: la gelatina A, extraída de la piel de cerdo mediante tratamiento ácido; la gelatina B, extraída de la piel y los huesos de bovinos mediante tratamiento con bases. Así que, mientras el ácido denatura y degrada las cadenas de colágeno, la base favorece también la hidrólisis de los grupos amídicos de la lisina y de la asparagina que pasan a ser, respectivamente, ácido glutámico y ácido aspártico. El tipo de pretratamiento químico y los parámetros físicos de extracción pueden modificar el tamaño de las cadenas polipeptídicas y las propiedades funcionales de la gelatina.³⁸

Las cadenas peptídicas de la gelatina, en disolución diluida, a concentraciones inferiores a 0.5% p/V, o a valores elevados de temperatura, presentan una conformación *random coil*. Al revés, disoluciones concentradas o valores de temperatura más bajos de 35÷40 °C, favorecen la agregación de las cadenas y la formación de geles físicos termicamente estables. Estos geles también presentan regiones de triple helice, iguales a la molecula nativa de colágeno, que unen entre sí cadenas *random coil* (Fig. 3.5).³⁹ La gelatina se usa abundantemente en la industria alimentaria, farmacéutica y fotográfica, entre otras. En el sector biomédico la principal aplicación es relativa a la producción de cápsulas para la liberación controlada de fármacos de adsorción intestinal. El enorme empleo en campo biomédico constituye en sí mismo una confirmación de su biocompatibilidad.⁴⁰

Los trabajos realizados en esta memoria se llevan a cabo empleando gelatina de tipo A, proporcionada por Sigma-Aldrich (Batch#1189632-52205137). En todo los casos, la gelatina se somete a un tratamiento de purificación previamente a su utilización (ver apartado 3.2.2.2).

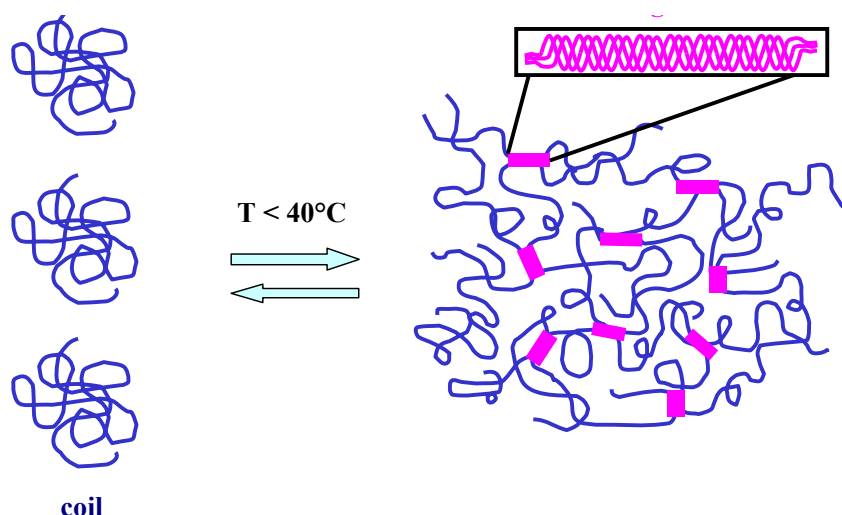


Figura 3.5. Esquema del proceso de gelación física de la gelatina.

3.1.1.3.2. Polímeros sintéticos tipo “elastina”

La elastina es una proteína estructural elástica del tejido conjuntivo. En los vertebrados se encuentra mayoritariamente donde el tejido está sujeto a repetidos ciclos de extensión-relajación (como arterias, ligamentos, tendones, pulmones, piel, cartilago elástico).⁴¹ Aproximadamente el 90% de sus aminoácidos son de resto lateral apolar aunque también contiene aminoácidos muy exóticos, como la desmosina, la isodesmosina, o la alodesmosina,

que sirven para establecer entrecruzamientos entre varias cadenas de elastina. Una de las principales características de este tipo de polímeros es la presencia de numerosas secuencias de aminoácidos que se repiten a lo largo de su cadena, como la VPG, VPGG, GVGVP, IPGVG, VAPGVG (Fig. 3.6).⁴² La más común es la secuencia GVGVP, la cual aparece en fragmentos que contienen hasta 11 pentapéptidos consecutivos (VPGVG)₁₁.⁴³

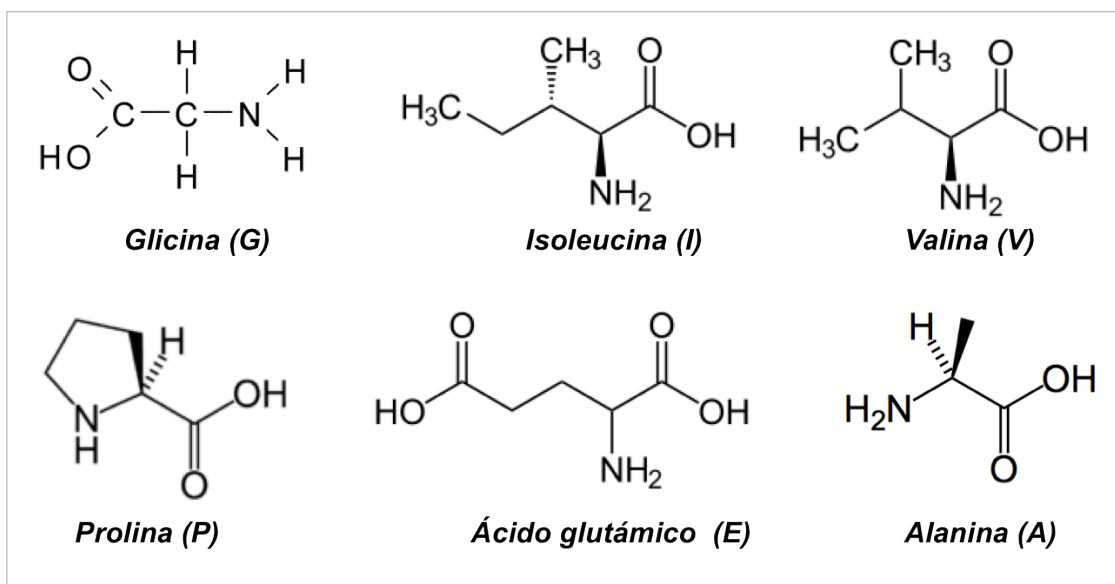


Figura 3.6. Aminoácidos más comunes en las cadenas de elastina.

El comportamiento quizá más sorprendente de esta proteína ha sido descubierto en un fragmento de esta proteína natural, la α -elastina. Cuando la α -elastina está en disolución acuosa, experimenta una transición desde un estado desordenado a un estado ordenado en el que las moléculas son capaces de agregarse, formando una fase densa y pegajosa. Lo que resulta más llamativo de esta transición desorden→orden, es que se da cuando la temperatura de la disolución aumenta (en estas muestras naturales, al pasar de 15 °C a 25 °C).⁴⁴

Los polímeros tipo elastina son polipéptidos artificiales constituidos a partir de la repetición de secuencias que se encuentran identificadas en la elastina natural como pueden ser el poli(VPG), poli(VPGG), poli(GVGVP), poli(IPGVG), poli(VAPGVG), poli(VGGVG) entre otros o alguna modificación a posteriori de ellas.⁴⁵ De entre todas estas combinaciones muchos polímeros artificiales se han sintetizado con la fórmula general poli(VPGXG) donde X representa cualquier aminoácido excepto la prolina. La característica común de todos estos poli-pentapéptidos es que presentan la transición del tipo desorden→orden que presenta la α -elastina. Y de todos ellos el más estudiado, sin ninguna duda, es poli(VPGVG).

Los trabajos realizados en esta memoria se llevan a cabo empleando dos tipos distintos de polímeros sintéticos tipo elastina proporcionados por el Prof. Cabello. La EL2bCR y la EL4bCR que consisten en cadenas del tipo poli(L-valina-L-prolina-L-alanina-L-valina-L-glicina) (VPAVG) unidas a una secuencia (VPGVG), donde la segunda valina se reemplaza por un ácido L-glutámico (E) cada cinco pentapéptidos (Fig. 3.7).⁴⁶ En particular, la EL2bCR (MW=58.5 KDa) presenta una arquitectura lineal, tipo dibloque AB ($[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)]_{20}-(VPAVG)_{40}$) mientras que la EL4bCR3 (MW=92.9 KDa) presenta una arquitectura lineal tipo tetrabloque $(AB)_2$ ($\{[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)]_{10}-(VGIPG)_{60}\}_2$).

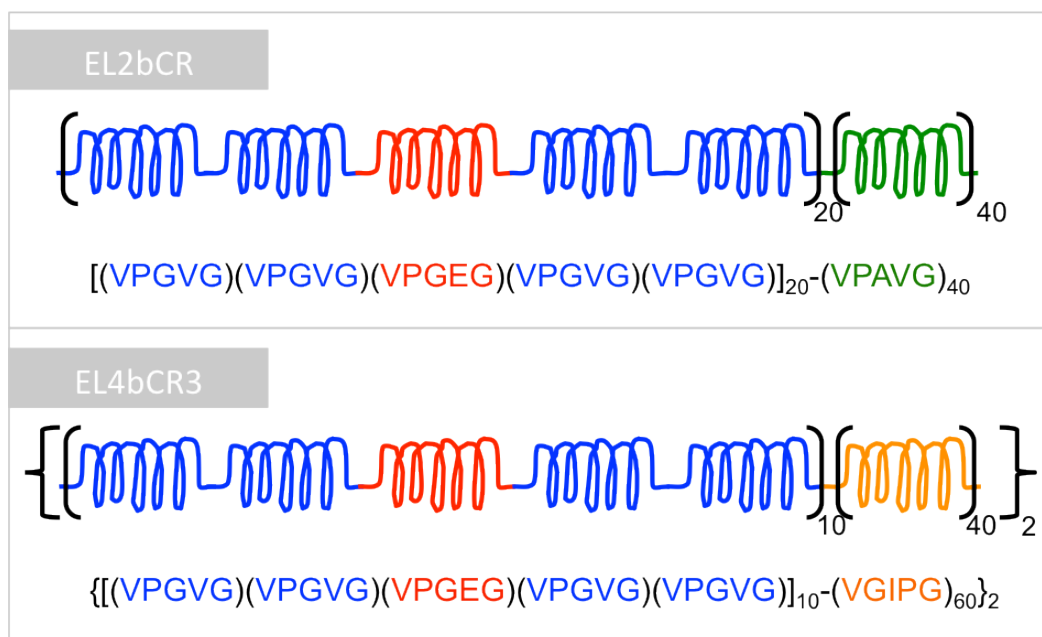


Figura 3.7. Esquema de la arquitectura lineal de las elastinas: EL2bCR y EL4bCR3.

3.1.2. COMPONENTES PARA ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

3.1.2.1. Fármaco: Ciprofloxacino

El ciprofloxacino (ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico, CFX) es un antibacteriano que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas. En concreto, la estructura química del CFX es mostrada en la figura 3.8. Es un polvo cristalino, amarillo pálido, prácticamente insoluble en agua, muy poco soluble en etanol y en cloruro de metileno. Es soluble en ácido acético diluido.⁴⁷⁻⁴⁸ La actividad antibacteriana depende de la presencia del átomo de flúor en la posición 6 de la molécula y también de un grupo piperazina heterocíclico en la posición 7. El átomo de flúor en C-6, controla la unión y los efectos sobre el

complejo DNA girasa o topoisomerasa IV, y la penetración intrabacteriana, favoreciendo notablemente la potencia antibacteriana de esta molécula.⁴⁹ Los ensayos de liberación controlada de fármaco realizados en esta memoria se llevan a cabo empleando CFX proporcionado por los laboratorios Normon, S.A. (Lote: CIC2071). En todo los casos, CFX se somete a un tratamiento de doble liofilización previamente a ser utilizado (ver apartado 3.2.1.2).

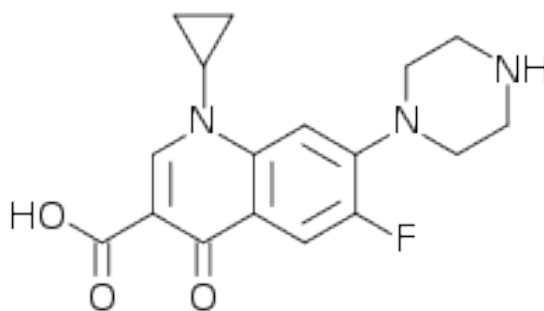


Figura 3.8. Estructura química del ciprofloxacino.

3.1.2.2. Proteína morfogenética ósea: rhBMP-2

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) constituyen un grupo de sustancias osteoinductoras pertenecientes a la superfamilia de factores de transformación del crecimiento tipo β (TGF- β).⁵⁰ La proteína BMP-2, igual que otras proteínas morfogénicas óseas, juega un importante papel en el desarrollo del hueso y del cartílago. Los actuales avances en biología molecular han permitido la síntesis de algunos miembros de esta familia, entre los que destaca la rhBMP-2 (BMP-2 recombinante humana), cuyos principales efectos son activar la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos y potenciar la actividad de deposición de calcio de estos tipos celulares. Actualmente se utiliza rhBMP-2 en cirugía ortopédica y traumatología y también en el campo de la odontología.⁵¹⁻⁵²

Los ensayos de liberación controlada de proteína realizados en esta memoria se llevaron a cabo empleando rhBMP-2 proporcionada por los laboratorios Noricum, S.L.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ESTRUCTURAS 3D DE QUITOSANO CON CFX Y rhBMP-2

3.2.1.1. Modificación y caracterización del quitosano

La caracterización del quitosano se realiza en los laboratorios Noricum S.L. (Dra V. Ramos).

3.2.1.1.1. Degradación del quitosano

Con el fin de obtener un quitosano con menor peso molecular y con mejor grado de desacetilación se realiza un tratamiento de desacetilación mediante autoclavado (*Autoclave OT032, Nuve Sanayi*). Para ello, se prepara una disolución homogénea de quitosano al 2.83% (p/p) en ácido acético 0.15M (pH=4.5), que se mantiene en agitación durante una día a temperatura ambiente. A continuación, se realiza un tratamiento de autoclavado a 121 °C y 0.90 atm durante 30 minutos. Para la caracterización químico-física del quitosano desacetilado, se realiza una precipitación de la disolución polimérica incrementando el pH hasta 6.8. A continuación, se lava repetidamente el precipitado con agua destilada y se liofiliza (*ThermoSavant Micromodulyo freeze-drier*). En la preparación de los *scaffolds* se emplea directamente la disolución de quitosano degradado, dejada enfriar hasta temperatura ambiente.

3.2.1.1.2. Determinación del peso molecular medio

Para la determinación del peso molecular medio, se preparan disoluciones de quitosano a una concentración de 1 mg/mL. En particular, para disolver la muestra de quitosano con intervalos de M_w entre 0.9 y $11.4 \cdot 10^5$ Da se emplea una disolución de ácido acético 0.1 M con una fuerza iónica de 0.2 M de NaCl y pH 2.56 (solvente de Roberts). La medida de viscosidad (η) se realiza a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, empleando un viscosímetro capilar de tipo Ubbelohde (*Schott-Geräte*) dentro de un baño con termostato (*Schott-Geräte*) y acoplado a un crónometro automático de precisión (*ViscoClock, Schott-Geräte*). El viscosímetro se calibra midiendo la viscosidad cinemática del solvente por triplicado. A continuación se introducen 12 mL de la muestra problema y se mide la viscosidad cinemática. Se miden un total de 6 disoluciones de la muestra problema, preparadas añadiendo 1 mL de solvente dentro del mismo viscosímetro. Todas las disoluciones se miden por triplicado. La η se calcula a partir de los datos de viscosidad cinemática con ayuda de las ecuaciones de Huggins, Kraemer y del punto crítico. Con el valor de η la se calcula M_w , a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. Los valores de las constantes empleadas para soluciones de quitosano en el solvente de Roberts en esta ecuación son $a = 0.93$ y $K = 1.81 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$.⁵³

3.2.1.1.3. Determinación del contenido en cenizas

Para realizar la determinación del contenido en cenizas, se sigue el método estandarizado descrito en el documento F2103-01 publicado por la ASTM (*American Society for Testing Materials*).⁵⁴ Se emplean crisoles de porcelana vitrificada (*modelo 79MF, W Haldenwanger Technische Keramik GmbH&Co, Waldkraiburg, Alemania*), los cuales se tratan en un horno de mufla (*Vulcan TM A-130, Vulcan Engineers Ltd., Sheffield, Inglaterra*) a 650 °C entre 6 y 8 horas. Una vez tarados, se añade en éstos la muestra de quitosano, entre 1.5 y 2.0 g, registrándose su peso con una balanza (*Precisa 40SM-200A, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Suiza*). Las muestras se incineran en la misma mufla a 800 °C durante un mínimo de 6 horas, se dejan enfriar hasta 100 °C. Se trasladan a un desecador con gel de sílice, se dejan enfriar hasta temperatura ambiente y se pesan nuevamente para registrar la pérdida de peso. Este proceso se realiza por triplicado para verificar la repetividad. De esta manera, el porcentaje de cenizas se determina como la relación porcentual del peso anterior y posterior al proceso, según la fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = [(P_c + M_f) - P_c] / [(P_c + M_i) - P_c] * 100$$

Donde P_c es el peso del crisol, M_i el peso inicial y M_f el peso final de la muestra.

3.2.1.1.4. Determinación del grado de humedad

Para determinar la humedad de las muestras de quitosano, se sigue el método estandarizado descrito en el documento F2103-01 publicado por la ASTM (*American Society for Testing Materials*). Se utilizan crisoles especiales (*Schott Duran DIN 12336, Schott Glaswerke, Mainz, Alemania*) para dicha aplicación. Éstos se tratan durante dos horas en estufa de vacío (*Vaciotem, J.P. Selecta S.A., Barcelona, España*) a una temperatura de 105 °C y una presión de 0.9 bar. A partir de esas dos horas se controla que el peso de los crisoles se mantiene constante. Una vez tarados los crisoles y a temperatura ambiente, se añaden aproximadamente 350 mg de muestra, pesados exactamente. Se desecan las muestras a 105 °C y 0.9 bar durante un mínimo de 2 horas. Las muestras se miden por triplicado. Se calcula el grado de humedad de forma semejante al grado de cenizas, según la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = [(P_c + M_f) - P_c] / [(P_c + M_i) - P_c] * 100$$

Donde P_c es el peso del crisol, M_i el peso inicial y M_f el peso final de la muestra.

3.2.1.1.5. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico consiste en medir los cambios de masa de una muestra sometida a un programa de calentamiento. Estas pérdidas de masa se utilizan para calcular o aproximar la cantidad de fase que se descompone. El análisis se lleva a cabo en un equipo termogravimétrico Seiko modelo EXSTAR 6300 con una velocidad de calentamiento de 20 °C/minuto en atmósfera de N₂. El análisis se realizó usando aproximadamente 10 mg de cada una de las muestras las que se calientan desde temperatura ambiente hasta 800 °C.

3.2.1.1.6. Determinación de la viscosidad estática de las disoluciones de quitosano

La viscosidad estática de las disoluciones de quitosano, se evalúa utilizando un viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DV-II, con un husillo CP-41. El viscosímetro rotacional consta básicamente de dos partes que se encuentran separadas por el fluido a estudiar, en este caso una superficie y un cono de pequeño ángulo. El movimiento del cono provoca la aparición de un gradiente de velocidades a lo largo del fluido. La viscosidad del fluido se mide con el esfuerzo necesario para producir una determinada velocidad angular. Las mediciones se realizan con soluciones de polímero al 2.83% p/p, a una temperatura de 25±0.1 °C.

3.2.1.2. Doble liofilización de CFX

Para mejorar la solubilidad de CFX se realiza una doble liofilización de este principio activo. Se prepara una solución acuosa de CFX al 9.5% p/p (solución sobresaturada), solubilizada con calor a 80 °C. Tras la total disolución del principio activo, la solución se deja enfriar a temperatura ambiente y se agita en vórtex para su inmediato congelado en nitrógeno líquido y posterior liofilización. A partir del liofilizado, se prepara nuevamente una solución sobresaturada de CFX y se repite el procedimiento anterior. El producto liofilizado se caracteriza mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de Rayos-X (DRX) ([ver apartado 3.2.1.3.2](#)). Este CFX (doblemente liofilizado) es que lo se emplea para la preparación de los *scaffolds*.

3.2.1.3. Estudio de la precipitación de fosfato de calcio y CFX en disolución acuosa

Con fines comparativos, se estudian las formas cristalinas de fosfato de calcio y CFX que precipitan en una disolución acuosa ácida en presencia del sistema urea/ureasa ([ver apartado 4.1.3](#)), se realizan estudios en disolución sin quitosano.

3.2.1.3.1. Medidas de pH de disoluciones acuosas contenente fosfato de calcio y/o CFX

A 2.0 g de una disolución acuosa de ácido acético 0.15M se añaden 0.250 mL de una disolución de fosfato de calcio-urea (urea 2M y $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 0.03M disueltos en HCl 0.3M; pH=3.0) y 0.250 mL de una disolución de CFX disuelto en AcOH 0.15M (CFX 40 mg/mL). A continuación, se añaden 0.015 mL de NaOH 10M para obtener una disolución con pH=4.5. Esta solución se coloca en un baño termostático a 37 °C y se añaden 0.175 mL de una solución acuosa de ureasa (45 U/mL). Mediante pHmetro (Jenway - Modelo 3520) se mide la variación de pH en el tiempo. El experimento se repite, según el mismo protocolo, también a 4° C. De forma análoga, para la preparación de las disoluciones sin CFX, en lugar de añadir CFX disuelto en ácido acético, se añade la misma cantidad de AcOH 0.15M (0.250 mL) y se sigue el mismo protocolo (a 4 y a 37 °C). Con el fin de caracterizar los productos precipitados en las distintas condiciones experimentales, se extrae una alícuota de cada disolución para análisis TEM y lo restante se recupera centrifugando las disoluciones (10000 rpm; 10min; a 37 °C o 4 °C en función de la temperatura de las correspondientes medidas de pH), se elimina el sobrenatante y se liofiliza el producto.

3.2.1.3.2. Caracterización del fosfato de calcio y del CFX

La caracterización química y morfológica de los productos de precipitación (nanopartículas y cristales de fosfato de calcio y de CFX) se lleva a cabo mediante diferentes técnicas (TEM, SEM, EDX, DRX, RMN).

Las micrografías de TEM y los análisis de dispersión de electrones en área seleccionada (SAED) se adquieren en un microscopio 200 KeV JEOL-2000 FXII perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC), a cargo de los Drs. P. Herrero y À. Landa. La preparación de las muestras se lleva a cabo depositando una gota de cada alícuota de la muestra a estudiar sobre rejillas de Cu. Estas se dejan secar hasta la completa eliminación del líquido dispersante.

Las micrografías de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM) y los análisis de espectroscopía de energía de dispersión de rayos X (*X-ray Energy Dispersive Spectroscopy*, EDX) se adquieren en un microscopio Nova Model NanoSEM 230 perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del ICMM-CSIC. La preparación de las muestras se lleva a cabo pegando el espécimen a estudiar sobre portamuestras metálicos, utilizando una cinta conductiva de carbón de doble cara.

El análisis de difracción de Rayos-X (*X-ray diffraction*, DRX) de las muestras se lleva a cabo en un Difractómetro de polvo Bruker D8 Advance con radiación de $\text{CuK}\alpha$ (pulsos de 6s, cada 0.05°) perteneciente a la unidad de apoyo de difracción de Rayos-X del ICMM-CSIC, a cargo del Dr. E. Gutiérrez Puebla.

Las análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido (^1H -RMN, ^{13}C -MASRMN, ^{13}C -CPMAS-RMN) se realizan con un equipo Bruker Model AV-400-WB (9.4 T, con una sonda Bruker de 4 mm), perteneciente al servicio interdepartamental de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (SIdI-UAM). Las frecuencias usadas en los experimentos ^{31}P y ^1H -RMN son, respectivamente, de 162 y 400 MHz. La frecuencia de giro en los experimentos ^{31}P y ^1H -MAS (giro al ángulo mágico) es de 10kHz. En general, las medidas se realizan pesando 5 mg de cada muestra. Los espectros de ^{31}P -RMN de estado sólido se adquieren mediante radiación directa con ancho espectral de 35 kHz, 10s de tiempo de relajación y un pulso de $\pi/6$ de 50 kHz. Las anchuras espectrales de los espectros ^1H -RMN de estado sólido son de 35 y 50 kHz, con un tiempo de relajación de 10s y un pulso de $\pi/3$ de 50 kHz. El desplazamiento químico en los espectros de estado sólido ^{31}P -RMN es referido al amonio H_3PO_4 85% (como referencia primaria) y al difosfato de amonio (a -0.82 ppm como referencia secundaria). El desplazamiento químico en los espectros de estado sólido ^1H -RMN es referido a TMS (como referencia primaria) y H_2O (a 4.77 ppm como referencia secundaria).

3.2.1.4. Preparación de los *scaffolds* de quitosano

3.2.1.4.1. Preparación asistida por ureasa de los *scaffolds* de quitosano con y sin CFX

Para la preparación de los *scaffolds* de quitosano-CFX se parte de una disolución homogénea de quitosano al 2.83% (p/p) en ácido acético 0.15M (pH=4.5); la cual se mantiene agitando durante una noche a temperatura ambiente. A 2.0 g de esta solución de quitosano se agregan 0.250 mL de una solución de urea 2M (urea disuelta en HCl 0.3M; pH=3.0) y 0.250 mL de una disolución de CFX disuelto en ácido acético 0.15M (CFX 40 mg/mL). Estas soluciones se colocan en un baño de hielo a 4°C . Una vez enfriadas se adicionan 0.175 mL de una solución acuosa de ureasa (32U/mL para las muestras “125”, 38.5 U/mL para las muestras “150”, y 45 U/mL para las muestras “175”) y se mantienen agitando durante 30 minutos. Un mililitro de cada solución se recoge en jeringas de insulina que se incuban a 37°C durante 24 horas. Una vez gelificadas, las muestras se someten al proceso ISISA a velocidad de inmersión constante (0.7 mm/min, mediante *dip-coating*) en un baño de nitrógeno líquido (contenido en

un “dewar”), con una temperatura constante de -196°C . Una vez congelada y criofracturadas las muestras se liofilizan durante 24 horas.

De forma análoga, para la preparación de los *scaffolds* de quitosano sin CFX, en lugar de añadir la disolución de CFX, se añade la misma cantidad de AcOH 0.15M y se sigue el mismo protocolo.

3.2.1.4.2. Preparación asistida por ureasa de scaffolds de quitosano-ACP con y sin CFX

Para la preparación de los *scaffolds* de quitosano-ACP-CFX, se parte de una disolución homogénea de quitosano al 2.83% (p/p) en ácido acético 0.15M (pH=4.5); la cual se mantiene agitando durante una noche a temperatura ambiente. A 2.0 g de esta solución de quitosano se agregan 0.250 mL de una solución de fosfato de calcio-urea (urea 2M y $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 0.03M disueltos en HCl 0.3M; pH=3.0) y 0.250 mL de una disolución de CFX disuelto en ácido acético 0.15M (CFX 40 mg/mL). Estas soluciones se colocan en un baño de hielo a 4°C . Una vez enfriadas se adicionan 0.175 mL de una solución acuosa de ureasa (32U/mL para las muestras “125”, 38.5 U/mL para las muestras “150”, y 45 U/mL para las muestras “175”) y deja bajo agitación 30 minutos. Un mililitro de cada disolución se recoge en jeringas de insulina que se incuban a 37°C durante 24 horas. Una vez gelificadas, las muestras se someten al proceso ISISA a velocidad de inmersión constante (0.7 mm/min) en un baño de nitrógeno líquido (contenido en un “dewar”), con una temperatura constante de -196°C . Una vez congelada y criofracturadas las muestras se liofilizan durante 24 horas.

De forma análoga, para la preparación de los *scaffolds* de quitosano-ACP sin CFX, en lugar de añadir la disolución del fármaco, se añade la misma cantidad de AcOH 0.15M y se sigue el mismo protocolo.

3.2.1.4.3. Preparación asistida por ureasa de scaffolds de quitosano-ACP con y sin rhBMP-2

Para la preparación de los *scaffolds* se parte de una disolución homogénea de quitosano al 2.83% (p/p) en ácido acético 0.15M (pH=4.5); la cual se mantiene agitando durante una noche a temperatura ambiente. A 2.0 g de esta solución de quitosano se agregan 0.250 mL de una solución de fosfato de calcio-urea (urea 2M y $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 0.03M disueltos en HCl 0.3M; pH=3.0) y 0.250 mL de una disolución rhBMP-2 disuelta en ácido acético 0.15M (rhBMP-2 2mg/mL). Estas soluciones se colocan en un baño de hielo a 4°C . Una vez enfriadas se adicionan 0.175 mL de una solución acuosa de ureasa (45 U/mL) y se deja bajo agitación 30 minutos. Un mililitro de cada disolución se recoge en jeringas de insulina que se incuban a 37°C

°C durante 24 horas. Una vez gelificadas, las muestras se someten al proceso ISISA a velocidad de inmersión constante (0.7 mm/min) en un baño de nitrógeno líquido (contenido en un “dewar”), con una temperatura constante de -196 °C. Una vez congelada y criofracturadas las muestras se liofilizan durante 24 horas. De forma análoga, para la preparación de los *scaffolds* de quitosano-ACP sin rhBMP-2, en lugar de añadir la disolución de proteína, se añade la misma cantidad de AcOH 0.15M (0.250 mL) y se sigue el mismo protocolo.

Todos los *scaffolds* descritos en este apartado se preparan con quitosano tal y como se recibe de Aldrich o con quitosano degradado.

3.2.1.4.4. Nomenclatura *scaffolds* de quitosano con CFX o rhBMP-2

Se preparan *scaffolds* de distintas composiciones y con diferentes cantidades de ureasa. Para identificar cada muestra se asigna un acrónimo del tipo “X-Y-Z”, donde con “X” se indica el nombre del tipo de biopolímero usado (quitosano o quitosano degradado), con “Y” los componentes añadidos (el antibiótico, la proteína, la apatita), con “Z” la cantidad de ureasa empleada para la formación del hidrogel. Por ejemplo, uno *scaffold* de quitosano degradado con fosfato de calcio y CFX, obtenido añadiendo una solución acuosa de ureasa 45 U/mL, tendrá el siguiente acrónimo: QDPX175. En la [Tabla 3.1](#) se resumen las siglas empleadas para identificar los *scaffolds* preparados.

Tabla 3.1. Siglas empleadas para identificar los *scaffolds* preparados.

Componentes		Acrónimo
Polimero	Quitosano	Q
	Quitosano degradado	QD
Aditivos	Fosfato de calcio	P
	Ciprofloxacino	X
	Proteína rhBMP-2	B
Cantidad de Ureasa	32 U/mL	125
	38,5 U/mL	150
	45 U/mL	175

3.2.1.5. Caracterización de los *scaffolds* para liberación controlada

Los fragmentos empleados tanto en los estudios realizados en este trabajo como en la caracterización corresponden a zonas de los *scaffolds* congeladas una vez que la velocidad de avance del frente de hielo había alcanzado un valor estacionario ([ver apartado 1.2.2](#)). Es en esta zona donde se consigue una estructura regular de canales interconectados. Los fragmentos de *scaffold* correspondientes a la primera zona de las muestras en tomar contacto con el baño frío, aproximadamente los 3 primeros centímetros, fueron desechados.

3.2.1.5.1. Caracterización morfológica de los *scaffolds* de quitosano

El análisis mediante microscopia SEM permite el estudio de la morfología de los *scaffolds*, observando secciones de muestras fragmentadas por criofractura (cortes limpios que muestran secciones internas de los *scaffolds*). La preparación de las muestras se lleva a cabo fijando cada *scaffold* sobre portamuestras metálicos, utilizando un pegamento conductor de grafito, y metalizando con oro mediante un equipo de Sputtering Balzers, modelo SCD-004 (250 segundos y a una diferencia de potencial entre 15 y 20 kV). Las micrografías de SEM para estas muestras se adquieren en un microscopio EDX/SEM Zeiss DSM-950 perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Ciencias Medioambientales de Madrid (CCMA-CSIC).

3.2.1.5.2. Caracterización del fosfato de calcio y del CFX en los *scaffolds* de quitosano

Con el fin de caracterizar el tipo de fosfato de calcio precipitado en los distintos *scaffolds* de quitosano, fragmentos de cada matriz polimerica, oportunamente molido, se someten a tratamiento de plasma-ionización (Tetra Pico - Diener Electronic) durante 20 horas a 20 °C. Se utiliza oxígeno comercial, filtrado en la camara de descarga, a una presión de 0.4 mbar. El generador de plasma trabaja a una frecuencia de 40 kHz y la energía utilizada en los experimentos es de ≈ 300 W. A continuación, la caracterización del fosfato de calcio presente en estas muestras se lleva a cabo mediante TEM, EDX, DRX ([ver apartado 3.2.1.3.2](#)). En particular, la preparación de las muestras para análisis TEM se lleva a cabo mediante preparación de una dispersión muy diluida del espécimen a estudiar, en acetona. A continuación, se deposita una gota de la dispersión sobre rejillas de Cu. Estas se dejan secar hasta la completa eliminación del líquido dispersante. Las análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido (^1H -RMN, ^{13}C -MAS-RMN, ^{13}C -CPMAS-RMN)

se realizan con un equipo Bruker Model AV-400-WB, perteneciente al servicio interdepartamental de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (SIdI-UAM).

3.2.1.5.3. Determinación del tiempo de gelificación del quitosano

La capacidad de gelificación del quitosano con urea/ureasa se analiza mediante medidas del módulo elástico, G' , del módulo viscoso, G'' , y de la tangente del ángulo de desfase, $\tan \delta$, en función del tiempo, de las distintas disoluciones de quitosano (con y sin CFX y fosfato de calcio) añadiendo ureasa 45 U/mL. Los ensayos se realizan a una frecuencia constante (1 Hz) en la región viscoelástica lineal, o sea en aquel intervalo de esfuerzos (σ) para el cual se observa un comportamiento viscoelástico lineal. El tiempo de gelificación (*gel point*) se identifica con el punto de cruce de las curvas de los módulos elástico y viscoso, (G' , G''). Por otra parte, el tiempo de gelificación también se determina empleando el criterio de Winter-Chambon, mediante experimentos en el rango de 1 a 10 Hz, con el objetivo de validar los valores alcanzados en las pruebas de tiempo de barrido en una frecuencia.⁵⁵ Todos los ensayos se realizan en un reómetro Bohlin CS con geometría de cilindros coaxiales y superficie interna lisa (C14) en el modo de oscilación, a 37 °C.

3.2.1.5.4. Determinación del grado de hinchamiento

El grado de hinchamiento se determina gravimétricamente a distintos tiempos. Pesada la matriz seca (W_{dry}) se sumerge en una solución de tampón fosfato (PBS) 0.1M (pH=7.0) a 37 °C. Antes de pesar la muestra hidratada (W_{wet}), el exceso de PBS se remueve por un papel de filtro previamente humedecido en la misma disolución. El peso de la matriz hidratada se controla a distintos tiempos. El grado de hinchamiento promedio para cada tiempo se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$G = [(W_{wet} - W_{dry}) / W_{dry}] \times 100$$

3.2.1.5.5. Determinación de la resistencia a la tensión de los scaffolds

Los ensayos de resistencia a la tensión se realizan en un equipo MTS-Synergie-200 donde se coloca un fragmento de cada *scaffold* entre dos mordazas separadas por una distancia de aproximadamente 10 mm (Fig. 3.9). La muestra se sujeta fuertemente, para evitar que se deslice durante el ensayo y se somete a un esfuerzo axial de tracción creciente hasta que se produce la ruptura de la muestra. Antes de sujetar entre las mordazas, cada *scaffold* se aplana hasta obtener fragmento de aproximadamente 15-20 mm de longitud, 3 mm de anchura y 0.5

mm de espesor. Por cada muestra se realizan 5 medidas. Las curvas obtenidas por el equipo corresponden a curvas de tensión-deformación, en la que se representan la deformación frente a la tensión (fuerza por unidad de sección que se hace para estirar la muestra).

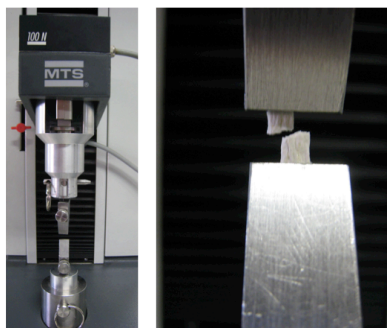


Figura 3.9. A la izquierda equipo MTS-Synergie-200 usado para las medidas de resistencia a la tensión; a la derecha la ruptura del fragmento de *scaffold* entre las dos mordazas.

3.2.1.6. Estudios de liberación controlada

3.2.1.6.1. Estudios de liberación controlada de CFX

La cuantificación de CFX en el estudio de liberación de los *scaffolds* de quitosano con CFX (QPX125, QPX150, QPX175, QX125, QX150 y QX175) se lleva a cabo mediante espectroscopía UV-VIS (espectrofotómetro Varian UV-VIS Modelo Carry 4000UV-VIS). Con esta técnica se compara la energía adsorbida por la muestra a un determinado rango de longitudes de onda, con la adsorbida por una muestra patrón de concentración conocida. El rango de longitudes de onda se selecciona tomando como referencia datos teóricos la bibliografía consultada.⁵⁶ Éste se fija entre 190 y 350 nm y se realizan varios barridos de absorción de una solución de CFX 4 µg/mL en tampón fosfato a pH 7.4 simulando de esta forma los fluidos corporales. Se observa que la longitud de onda correspondiente a la máxima absorción es a 276 nm. Seleccionada la longitud de onda, se realiza una curva de calibrado con concentraciones conocidas de CFX (2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 µg/mL) en tampón fosfato pH=7.4. Para estudiar la liberación de CFX, se pesan cantidades similares de cada *scaffold* y se introducen en un tubo de plástico de 15 mL que contiene 5 mL de dicho tampón como medio de liberación. Los estudios de liberación se realizan a una temperatura de 37 °C (en un baño Lauda E200, Ecoline, Staredition) y con una agitación constante (50 rpm, en un agitador orbital Edmund Bühler GMBH, Germany), para así permitir la difusión del CFX contenido en el *scaffold* hacia el medio de liberación. El medio se retira en su totalidad a tiempos predefinidos para permitir al sistema cumplir las condiciones de gradiente de concentración las cuales existen cuando el volumen del medio de liberación es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para preparar una solución saturada del principio activo.⁵⁷ El medio retirado se reemplaza por

tampón fosfato pH 7.4 fresco (5 mL) para mantener el volumen constante durante todo el ensayo. Todos los ensayos se hacen por triplicado. Las muestras procedentes de los ensayos de liberación de cada uno de los *scaffolds* se analizan a la longitud de onda determinada anteriormente (276 nm), utilizando como blanco tampón fosfato pH 7.4, y se cuantifican en función de la curva de calibrado obtenida en la validación.

3.2.1.6.2. Ensayo de liberación de rhBMP-2

Este trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo de Ingeniería de Tejidos dirigido por el Dr. López Lacomba del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid (IEB-UCM). Para estudiar la liberación de la proteína recombinante humana rhBMP-2 integrada en los *scaffolds* de quitosano liofilizados (QPB175, QB175, QDPB175, QDB175) se utiliza un *kit* de ELISA tipo sándwich (*Peprotech, UK*). Este ensayo se basa en la unión de la proteína a dos anticuerpos que la reconocen, el primero (anticuerpo de captura) unido a la base del pocillo de la placa y el segundo (anticuerpo de detección, marcado con biotina) por encima. A continuación se añade a la solución avidina-HRP (*Horse Radish Peroxidase*) que se une al anticuerpo de detección. Por último se añade el sustrato incoloro de la HRP (TMB, tetrametilbenzidina) que se convierte en un compuesto de color amarillo, detectable a 405 nm con corrección a 630 nm. Se utilizan placas de 96 pocillos (NUNC). Para la recta patrón se utiliza la misma proteína rhBMP-2 con la que se fabrican los *scaffolds*. Los ensayos se realizan por duplicado y se utilizan 12 puntos temporales (30min/1h/2h/3h/4h/5h/1 día/3d/5d/7d/9d/12d).

3.2.1.7. Ensayos *in vitro* e *in vivo*

Este trabajo se realiza en colaboración con el grupo de Ingeniería de Tejidos dirigido por el Dr. López Lacomba del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid (IEB-UCM).

3.2.1.7.1. Ensayos de proliferación *in vitro*

Para estudiar la proliferación celular *in vitro* sobre los *scaffolds* de quitosano liofilizado (QPB175, QB175, QDPB175, QDB175) se utiliza el ensayo del Alamar Blue (Invitrogen). El ensayo se basa en la adición de Resazurin al cultivo celular y tras 1h30min de incubación se mide la fluorescencia del medio. El Resazurin es un compuesto no fluorescente (azul) que tras una reacción de reducción por enzimas metabólicas se transforma en Resorufin, de color rojo,

altamente fluorescente. De este modo las células metabólicamente activas tendrán más señal que las células muertas, y a su vez, cuantas más células haya mayor actividad metabólica habrá en total. Para el ensayo se utilizan células C2C12 (línea celular premitótica de ratón) que se siembran sobre los *scaffolds* a una densidad de 200000 células por *scaffold*. Los distintos tipos de *scaffold* se colocan en placas de cultivo celular de 48 pocillos por triplicado (un *scaffold* por pocillo). Se utilizan 6 puntos temporales (1, 3, 5, 7, 9 y 11 días). Se utiliza una recta patrón con densidades celulares conocidas (10000, 20000, 40000, 60000 y 80000 células) sembradas sobre el plástico de las placas y medidas a día 1. De este modo se pueden interpolar los valores de fluorescencia para averiguar el número de células presentes en cada *scaffold*.

El procedimiento es el siguiente. Las células se concentran hasta obtener una concentración de 200000 células/10 μ L. Se siembran las células encima de los *scaffolds* y se mantiene en estufa de cultivos (37 °C, 5% CO₂) durante 15-30min para favorecer la adhesión de las células al soporte. A continuación se añaden 400 μ L de medio de cultivo DMEM y se llevan las placas de nuevo a la estufa de cultivos. La medición de cada punto temporal se realiza trasvasando el *scaffold* a un pocillo limpio y añadiendo 400 μ L de DMEM nuevo más 40 μ L del reactivo Alamar Blue. De este modo, la señal que se obtiene resulta ser de las células que han crecido únicamente adheridas al *scaffold* y no a células que han “caído” al fondo de la placa, evitando así una sobrevaloración de la medida. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se trasvasa el medio más reactivo a un pocillo nuevo, ya que el *scaffold* al ser opaco interfiere en la lectura de fluorescencia del lector de placas, y se realiza la lectura a una longitud de onda de Excitación/Emisión de 530nm/645nm.

3.2.1.7.2. Actividad de la fosfata alcalina (ALP)

La enzima fosfatasa alcalina es un indicador temprano de la diferenciación ósea. La actividad de esta enzima se determina y cuantifica de manera colorimétrica, empleando un sustrato que, tras la acción de la enzima, da lugar a un producto de intenso color amarillo. Para la realización del ensayo, se elimina el medio de cultivo y se lavan los pocillos con PBS, para eliminar los posibles restos de proteínas del suero fetal bovino. Se añaden 100 μ L de tampón de lisis a cada pocillo (Tris pH 6.8 50mM, Tritón X-1000 1%, MgCl₂ 2mM) y se realizan 3 ciclos de congelación-descongelación. Se separan 10 μ L del lisado celular y se le añaden 100 μ L de *buffer* sustrato (50 μ L de p-nitrofenilfosfato y 50 μ L de *buffer* 2-amino-2-metil-1-propanol). Después de una incubación de 15 minutos a 37 °C la reacción se para con 100 μ L de NaOH 0.5M y se midió la A450 en el lector de placas (Biotek FL-600).

3.2.1.7.3. Estudio preliminar del modelo experimental in vivo

En este experimento se implantan *scaffolds* del tipo QPB175, contenentes la proteína rhBMP-2, en hueso (meseta tibial) de conejo, induciendo la formación de tejido óseo ectópico en dicha zona. Se anestesian los animales y se realizan dos incisiones en una del cual se implanta un *scaffold* cilíndrico (de 10 mm de diámetro y 2 mm de grosor). A las cinco semanas de la realización del implante los animales se sacrifican. Los conejos se manipulan de acuerdo con el protocolo establecido (los experimentos se aprueban por el comité para la investigación con animales de la institución). Los estudios histológicos se realizan fijando las muestras con tampón neutro de formalina al 10%, embebidas en parafina y cortadas en láminas de aproximadamente de 4 μm de grosor. Estas láminas finas se tiñen con hematoxilina-eosina y tricromo de Masson. Todos los procedimientos de tinción histológicos e inmunohistoquímicos se realizan por los servicios de Dominion Pharmkine (www.pharmakine.com).

3.2.2. ESTRUCTURAS 3D DE NANOTUBOS DE CARBONO

3.2.2.1. Modificación y caracterización de los MWCNTs

3.2.2.1.1. Purificación de los MWCNTs

Los MWCNTs se purifican y funcionalizan mediante un tratamiento en ácido nítrico concentrado (14M). Se pesan 800 mg de MWCNTs en un matraz de fondo redondo y se añaden 40 mL de HNO_3 . Tras una noche en agitación la mezcla se calienta a reflujo durante 5 horas a 130°C. Finalizado el proceso se dejan enfriar a temperatura ambiente, se filtran a vacío utilizando filtros de celulosa regenerada con un tamaño de poro de 0.2 μm , y se lavan repetidamente con agua destilada hasta eliminar los restos ácidos, midiéndose un pH alrededor de 5.5 en las aguas de lavado. A continuación se congelan y se liofilizan durante 24 horas.

3.2.2.1.2. MWCNTs funcionalizados en medio ácido (NHTS)

Se sonicán 200 mg de MWCNTs previamente purificados en 12 mL de una mezcla 3:1 de H_2SO_4 y HNO_3 (9 y 3 mL, respectivamente) durante 4 horas. Para evitar un calentamiento excesivo se controla la temperatura del baño de sonicación (Bandelin Sondex Digitex - DT102H), cambiando el agua del baño y añadiendo hielo cada hora (nunca se superan los 40 °C). Finalizado el proceso se dejan enfriar. Una vez a temperatura ambiente, los nanotubos resultantes se filtran y se lavan con abundante agua destilada hasta eliminar completamente los restos de ácidos, tras lo cual se congelan y se liofilizan durante 24 horas.

3.2.2.1.3. Caracterización de los CNTs

Los CNTs se analizan mediante microscopía TEM (ver apartado 3.2.1.3.2). La preparación de las muestras se lleva a cabo preparando una dispersión muy diluida, en acetona, del espécimen a estudiar. A continuación, se pone en baño de ultrasonidos 4 minutos, y se deposita una gota de la dispersión sobre rejillas de Cu. Las muestras se dejan secar hasta la completa eliminación del líquido dispersante. Las micrografías de TEM y los análisis de dispersión de electrones en área seleccionada (SAED) se adquieren en un microscopio Philips Tecnai 20T perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Apoyo Tecnológico (CAT) de la Universidad Rey Juan Carlos, a cargo del Dr. J. González Casablanca.

3.2.2.2. Purificación de la gelatina

Este tratamiento prevé la disolución de 20 g de gelatina en 100 mL de agua destilada a 50 °C durante 3 horas, bajo agitación. Una vez disuelta, la disolución se deja enfriar, durante 2 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, en la nevera hasta la formación del gel físico. A continuación, el bloque de gelatina se dializa en agua destilada hasta llegar al valor de conductividad del agua (2 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Se disuelve de nuevo la gelatina a 50 °C, se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza. El liofilizado se almacena en la nevera a 4 °C.

3.2.2.3. Preparación de los *scaffolds* de CNTs

3.2.2.3.1. Preparación de suspensiones acuosas de CNTs

En primer lugar se preparan una serie de disoluciones de los diferentes polímeros a distintas concentraciones. Las disoluciones de sulfato de condroitina, ácido hialurónico, gelatina y elastina se preparan disolviendo en agua destilada, las correspondientes cantidades de cada polímero en función de la concentración deseada. Las disoluciones de quitosano se preparan disolviendo las correspondientes cantidades de quitosano en ácido acético (0.15 M; pH=4.5). Todas las disoluciones se mantienen en agitación durante un día. A continuación se añade, para cada concentración de nanotubos deseada (%p/p), la correspondiente cantidad de CNTs en 1 mL de la correspondiente disolución polimérica dispersante. Por ejemplo, para preparar una suspensión de MWCNTs al 6% p/p, se dispersan 60 mg de MWCNTs purificados en 1 gr de la disolución del agente dispersante. Todas las suspensiones se mantienen en agitación durante un día y se sonicen 4 minutos antes de ser congeladas empleando la metodología ISISA.

Los *scaffolds* de MWCNTs y NHTS se preparan siguiendo el mismo protocolo.

3.2.2.3.2. *Procesado ISISA de las dispersiones de CNTs*

Las suspensiones de CNTs se recogen en jeringuillas de insulina, de 1 mL de capacidad, y se congelan por inmersión longitudinal a velocidad constante (5.9 mm/min) en un baño de nitrógeno líquido (contenido en un “dewar”), con una temperatura constante de -196°C . Una vez congeladas y criofracturadas las muestras se liofilizan durante 24 horas. Con el fin de estudiar la influencia de la velocidad de congelado en la estructura de los *scaffolds*, se congelan varias suspensiones de CNTs empleando distintas velocidades de inmersión en el baño de nitrógeno líquido (0.72; 2.7; 5.9; 9.1 mm/min). Con el fin de estudiar la influencia de la temperatura de congelado en la estructura de los *scaffolds*, se congelan, a velocidad de inmersión constante, varias suspensiones de CNTs empleando un baño de etanol oportunamente enfriado. En particular, mediante enfriamiento con nieve carbonica se consigue enfriar el baño de etanol a una temperatura de $(-55\pm 1)^{\circ}\text{C}$, y mediante enfriamiento con refrigerador por inmersión (*Techne Calibration*) se consigue enfriar el baño de etanol a una temperatura de -50°C (o -80°C).

3.2.2.3.3. *Entrecruzamiento de las matrices*

Con el fin de reforzar las matrices, se usan distintos agentes entrecruzantes para los distintos polimeros. Los *scaffolds* de quitosano se entrecruzan mediante exposición a vapores de glutaraldehido (G). Tras 24 horas de exposición, a temperatura ambiente y agitando el entrecruzante (Fig. 3.10), los *scaffolds* se dejan airear durante 24 horas antes de ser sometidos a otros tratamientos, para eliminar así todo el entrecruzante que no ha reaccionado. Las demás matrices (de sulfato de condroitina, ácido hialurónico elastina, y gelatina) se entrecruzan mediante exposición a vapores de hexametilendiisocianato (HMDI). Tras 1 semana de exposición, a 37°C y manteniendo en agitación el entrecruzante (Fig. 3.10), los *scaffolds* se dejan airear durante 24 horas.

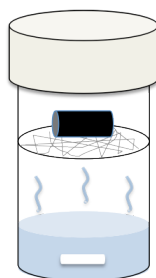


Figura 3.10. Esquema del procedimiento de entrecruzamiento de las matrices poliméricas.

3.2.2.4. Nomenclatura de los *scaffolds* con CNTs

A lo largo de este trabajo de tesis se han preparado *scaffolds* de distintas composiciones y con diferentes condiciones de procesamiento ISISA. Para identificar cada muestra se asigna un acrónimo del tipo “X-Y-Z-E”, donde con “X” se indica el nombre y el porcentaje en p/p del tipo de biopolímero usado (Q, CS, HA, GEL o EL), con “Y” el tipo de CNTs y el porcentaje en p/p, con “Z” las condiciones de procesamiento ISISA (velocidad y temperatura de congelado), con “E” el tipo de entrecruzante usado. Por ejemplo, una suspensión de MWCNTs 6% p/p en quitosano al 1% p/p, congelada a velocidad constante de 0.9 mm/min en un baño de nitrógeno líquido, y entrecruzada con glutaraldeído, tendrá el siguiente acrónimo: Q1W6v4G. En la [tabla 3.2](#) se resumen las siglas empleadas para formar los acrónimos de los *scaffolds* preparados.

Tabla 3.2. Siglas empleadas para identificar los *scaffolds* preparados.

Componentes y condiciones		Acrónimo
Polímero	Quitosano	Q
	Sulfato de condroitina	CS
	Ácido hialurónico	HA
	Gelatina	GEL
	Elastina	EL
CNTs	MWCNTs	W
	NHTS	N
Velocidad de congelado	0.9 mm/min	v4
	2.7 mm/min	v8
	5.9 mm/min	-
	9.1 mm/min	v21
Temperatura de congelado	Baño de nitrógeno líquido [T=-196 °C]	-
	Baño de etanol con nieve carbónica [T= -80 °C]	F
	Baño de etanol regulado con criostato	C
Entrecruzante	Glutaraldeído	G
	Hexametildiiisocianato	H

3.2.2.5. Caracterización de los *scaffolds* de CNTs

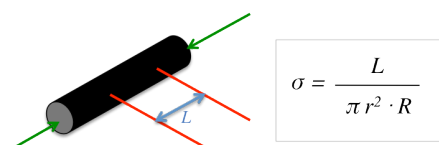
Los fragmentos empleados tanto en los estudios realizados en este trabajo como en la caracterización corresponden a zonas de los *scaffolds* congeladas una vez que la velocidad de avance del frente de hielo había alcanzado un valor estacionario ([ver apartado 1.2.2](#)). Es en esta zona donde se consigue una estructura regular de canales interconectados. Los fragmentos de *scaffold* correspondientes a la primera zona de las muestras en tomar contacto con el baño frío, aproximadamente los 3 primeros centímetros, fueron desechados.

3.2.2.5.1. Caracterización morfológica de los *scaffolds* de CNTs

El análisis mediante microscopia SEM permite el estudio de la morfología de los *scaffolds*, observando secciones de muestras fragmentadas por criofractura.

3.2.2.5.2. Medidas de conductividad

La conductividad de los *scaffolds* se mide utilizando un método típico de cuatro puntas ([Fig. 3.11](#)) a temperatura ambiente. Se aplica una corriente constante de 1 mA entre los contactos de plata Hi y Lo con un multímetro digital Fluke 8840. Estos contactos se colocan en el eje longitudinal del *scaffold* cilíndrico (de 1 cm de longitud) con un par de micromanipuladores. La caída de potencial en la superficie del cilindro se mide con otros dos electrodos de plata que se disponen presionando suavemente sobre la superficie del *scaffold* con la ayuda de otro par de micromanipuladores. La precisión de las medidas de potencial de corriente directa es de alrededor 1 μV . Se realizan diversas medidas con diferentes separaciones entre los electrodos de medida, permitiendo un cálculo preciso de la conductividad aplicando la ecuación:


$$\sigma = \frac{L}{\pi r^2 \cdot R}$$

Siendo L la distancia entre los electrodos de plata posicionados arriba del *scaffold*, R la medida proporcionada por el multímetro en el sistema de cuatro puntas y r el diámetro del fragmento cilíndrico del *scaffold*.

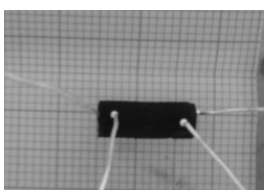


Figura 3.11. Fotografía del sistema de medida de conductividad. Las cuatro puntas están tocando la superficie de un *scaffold*.

3.2.2.5.3. Medidas mecánicas: pruebas de flexión

Los ensayos se realizan mediante un equipo perkin-Elmer DMA7. La configuración de ensayo es la flexión por tres puntos. La muestra (*scaffold* cilíndrico de 1.2 cm de longitud y 0.45 cm de diámetro) se coloca sobre un puente, con apoyo en dos puntos. La fuerza se aplica en el centro con la intención de flexionar la matriz porosa (Fig. 3.12).

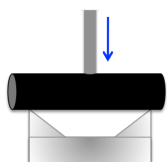


Figura 3.12. Esquema del sistema para las pruebas de flexión.

3.2.2.5.4. Análisis térmogravimétrico

El análisis termogravimétrico consiste en medir los cambios de masa de una muestra sometida a un programa de calentamiento. Estas pérdidas de masa se utilizan para calcular o aproximar la cantidad de fase que se descompone. El análisis se lleva a cabo en un equipo termogravimétrico Seiko modelo Exstar 6300 con una velocidad de calentamiento de 20°C/minuto en atmósfera de N₂. El análisis se realizó usando aproximadamente 10 mg de cada una de las muestras las que se calientan desde temperatura ambiente hasta 600 °C.

3.2.2.6. Ensayos de biocompatibilidad *in vitro*

Estos experimentos se realizan gracias a la colaboración de la Dra. C. Serrano del ICMM.

3.2.2.6.1. Células y medios de cultivo

Para la realización de los estudios de biocompatibilidad *in vitro* incluidos en la presente tesis doctoral se han utilizado los siguientes tipos celulares: fibroblastos de ratón L929, osteoblastos humanos Saos-2 (ambos tipos celulares cortesía de la Dra. M.T. Portolés de la Universidad Complutense de Madrid) y células endoteliales derivadas de progenitores periféricos (EC_{PC}) aisladas en colaboración en nuestro laboratorio a partir de muestras de sangre de cerdo obtenido de la fábrica de Campofrío (Madrid) y según protocolo⁵⁸⁻⁵⁹ previamente descrito. Tanto fibroblastos como osteoblastos son cultivados en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal, estreptomicina (100 UI ml⁻¹), penicilina (100 UI ml⁻¹) y L-Glutamina (1 mM). Por el contrario, las células EC_{PC} se cultivan en Endothelial Growth Medium 2 completo (EGM-2). Los cultivos celulares se mantienen a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂, con cambios de medio de cultivo cada 2 días, y,

una vez alcanzada confluencia (85-95%), se pasan mediante un protocolo estándar de tripsinización. Para la siembra se utilizan placas y botellines estándar de poliestireno tratados para cultivo celular (TCP) adquiridas a VWR y ThermoFisher, al igual que el material desechable estéril de rutina. Todos los reactivos, suplementos y medios de cultivo han sido adquiridos a Lonza Ibérica, a no ser que se indique explícitamente otra casa comercial.

3.2.2.6.2. Cultivo celular en condiciones estáticas

En primer lugar, los *scaffolds* (cilindros de 4.5 mm de diámetro y ~ 3 mm de espesor) se esterilizan mediante radiación UV durante 20 minutos por cada lado. A continuación se procede al condicionamiento de los mismos mediante inmersión en medio de cultivo completo durante 24 horas, con la finalidad de eliminar cualquier residuo tóxico procedente de la síntesis. Inmediatamente después, los *scaffolds* se colocan en placas de 48 pocillos y se siembran 10^5 células por *scaffold* en un volumen de 10-20 μL (cualquier variación de esta concentración en experimentos específicos será adecuadamente indicada), permitiendo la adhesión celular sobre el *scaffold* durante 20min a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo, se añaden 500 μL de medio de cultivo completo por pocillo, asegurando la completa inmersión del *scaffold*, y se mantiene el cultivo en condiciones estándar (37 °C - 5% CO_2) hasta el día de evaluación, con cambios de medio cada 2 días. En todos los experimentos, TCP se utiliza como superficie control.

3.2.2.6.3. Cultivo celular en condiciones de flujo

Una suspensión de fibroblastos L929 a una densidad de 10^6 células mL^{-1} se hace circular en flujo a través del *scaffold*, previamente esterilizado y sujeto a un tubo de vidrio mediante un fragmento de tubo termoretractil ([ver apartado 8.4.2](#)). Las células se hacen circular en el sistema a una velocidad de 0.250 mL/min durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la matriz se desmonta y se introduce en una placa de cultivo, donde se mantiene en incubación durante 24 horas en condiciones estándar (37 °C - 5% CO_2). La adhesión y la viabilidad celular en el *scaffold* se evalúa en distintos cortes transversal para confirmar la colonización tridimensional de la matriz.

3.2.2.6.4. Estudios de adhesión y morfología celular

Después de 2 días en cultivo, los *scaffolds* se lavan con PBS (2 veces) y se fijan con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 20 min. Después de lavar nuevamente con PBS, las

muestras se deshidratan mediante sustitución progresiva del agua con soluciones de etanol de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90%) (15 minutos, 2 veces), y una deshidratación final en etanol absoluto durante 30 minutos. Después de secar a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas, las muestras se montan en los soportes para SEM y se recubren con oro (ver apartado 3.2.1.3.2). La morfología de las células adheridas en los *scaffolds* se estudia mediante visualización con SEM.

3.2.2.6.5. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular en los distintos *scaffolds* se evalúa después de 5 días en cultivo, mediante marcaje de las células con el kit comercial *Live/Dead® Viability* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras marcadas se visualizan utilizando un microscopio confocal Leica SP5. La fluorescencia de las dos sondas (calceína y etidio homodímero-1) se excita mediante un láser de argón a 488nm. Después de la excitación, la fluorescencia emitida se separa utilizando un filtro dicróico triple 488/561/633 y se mide la fluorescencia verde (calceína) a 505-570 nm y la fluorescencia roja (etidio homodímero-1) a 630-750nm. Para visualizar la estructura del *scaffold* y localizar las células se emplea la reflexión física del *scaffold* excitando a 488 nm. Como resultado del marcaje, las células viables emiten fluorescencia verde debido a la calceína, mientras que las células muertas quedan marcadas en rojo por la incorporación del etidio homodímero-1 en la doble hélice de ADN. Para cuantificar la viabilidad celular, se hacen recuentos del número de células verdes (vivas) y rojas (muertas) en al menos seis campos de imagen distribuidos de manera aleatoria en las imágenes 20x obtenidas con el microscopio confocal. Los recuentos se expresan en porcentaje por campo de imagen como media \pm desviación estándar.

3.2.2.6.6. Estudios de apoptosis

Para detectar apoptosis en los cultivos celulares se utiliza un kit de Anexina V-FITC siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma). Brevemente, los osteoblastos Saos-2 y las células EC_{PC} se siembran a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células por *scaffold*. Después de 24 horas, los cultivos se lavan con PBS (dos veces) y se incuban con Anexina V-FITC (500 μ l en 5 μ l de PBS) durante 10 minutos en oscuridad. Las células teñidas se visualizan mediante un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B. Las células apoptóticas muestran una fluorescencia verde puntiforme correspondiente a regiones de membrana en las que se ha translocado

extracelulamente la fosfatidilserina, que queda así expuesta a la unión de la anexina V conjugada al isocianato de fluoresceína. El uso de una tinción simultánea con homodímero de etidio-1 permite la distinción entre células en estadios tempranos de apoptosis (fluorescencia verde), estadios tardíos (fluorescencia verde y roja) y células necróticas (sólo fluorescencia roja). Como control positivo de apoptosis, algunas células se exponen a H₂O₂ (1 mM en PBS) durante 1h30min antes de la incubación con Anexina V. La viabilidad celular de estos cultivos se ensaya en paralelo con calceína y homodímero de etidio-1, tal y como se ha descrito anteriormente.

3.2.2.6.7. Estadística

Los valores obtenidos se expresan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realiza con el software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 17.0. Las comparaciones de medias entre tres o más grupos se realizan mediante análisis de varianza (ANOVA), determinando posteriormente las diferencias dos a dos mediante la prueba *post hoc* de Scheffé (para grupos de varianza homogénea) o Games-Howell (para varianzas no homogéneas). Para las comparaciones de medias entre dos grupos, se utiliza el test *t Student*. En todas las evaluaciones, se considera estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$.

3.2.3. ELECTRODEPOSICIÓN EN FLUJO DE FOSFATO DE CALCIO SOBRE SCAFFOLDS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y QUITOSANO

3.2.3.1. Preparación del cátodo y montaje de la celda electrolítica

Los estudios de electrodeposición de apatita sobre *scaffolds* de quitosano y MWCNTs se llevaron a cabo trabajando con *scaffolds* del tipo Q1W6G, preparados empleando la metodología ISISA, según se describe en el [apartado 3.2.2.3.2](#).

El *scaffold* Q1W6G (*scaffold* cilíndrico de 1.2 cm de longitud y 0.45 cm de diámetro) se emplea como cátodo de la celda electrolítica. Para ello, el *scaffold* se adhiere a un hilo de carbono (*Goodfellow*) mediante un adhesivo conductor de grafito (*Graphite Conductor Adhesive 112, Electric Microscopy Science*), en un extremo del mismo. El electrodo, con el hilo de carbono que actúa como contacto eléctrico, se dispone junto a un tubo de vidrio hueco del mismo diámetro del *scaffold* (0.45 cm) y por el mismo lado donde se adhiere el hilo. El sistema se sella mediante un tubo de plástico termorretráctil transparente que, una vez montado

(Fig. 3.13) se introduce en una estufa a 120 °C durante 4 minutos. tras este tiempo el termoplástico contrae y permite la unión y sellado del sistema sin comprimir el *scaffold*.

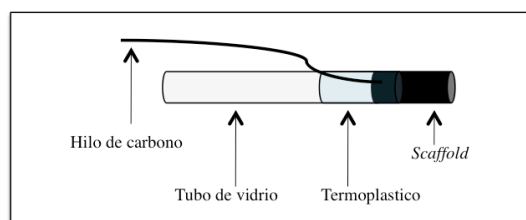


Figura 3.13. Esquema del montaje empleado para el electrodo de trabajo (cátodo).

A continuación, se monta la celda electrolítica (10 mL) con una configuración de tres electrodos sumergidos en la disolución electrolítica según se muestra en la figura 3.14.

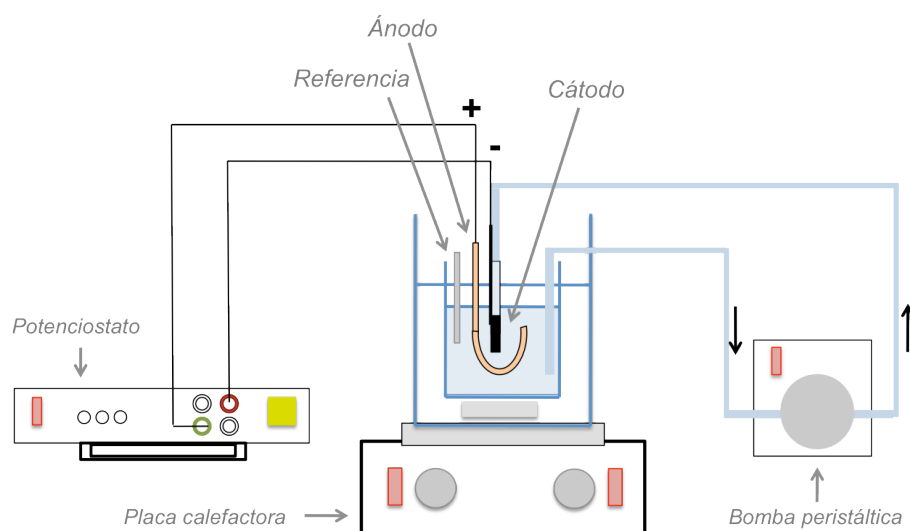


Figura 3.14. Esquema de la celda electrolítica.

Como electrodo de trabajo se usa el cátodo constituido por el *scaffold* Q1W6G, y como referencia un electrodo Ag/AgCl (3M) (CH Instruments). Como contraelectrodo se emplea una malla de platino (de 10 x 10 x 0.2 mm) oportunamente plegada para rodear la parte externa del *scaffold*, con el objetivo de producir un aumento local de la concentración de iones OH⁻ lo más homogénea posible. Los electrodos se conectan oportunamente a un potenciostato (VoltaLAB PGZ 301) acoplado a un PC que opera con software Voltamaster 4. La presencia de una bomba peristáltica (Ismatec - Model ISM597D) permite mantener un flujo fijo (0.25 mL/min) de la disolución electrolítica (ver apartado 9.3.2) por el interior del *scaffold*. Para garantizar el flujo de electrolito a lo largo del *scaffold* durante el experimento de electrodeposición, el tubo de

plástico (*Ismatec - ID 1.52 mm; Tygon*), que pasa a través de la bomba peristáltica, se conecta por un extremo al tubo de vidrio que constituye parte del electrodo de trabajo y por el otro extremo se sumerge en la disolución electrolítica. La celda electrolítica se coloca en un baño de silicona con control de temperatura conectado a una placa calefactora, para efectuar experimento en distintas condiciones de temperatura.

3.2.3.2. Electrodeposición en flujo de fosfato de calcio sobre *scaffolds*

La electrodeposición de fosfato de calcio sobre los *scaffolds* se realiza mediante experimentos de cronopotenciometría manteniendo un voltaje constante sobre el electrodo de trabajo y observando los cambios de intensidad de corriente en el tiempo. Se desarrollan los experimentos de acuerdo a las variables: voltaje (1.4V, 1.8V o 2.1V); temperatura (30°C, 60°C o 90°C); tiempo de aplicación de voltaje (30 minutos o 3 horas). El proceso de electrodeposición se controla potencioestáticamente.

3.2.3.3. Caracterización del sistema electrodepositado

La morfología del *scaffold* electrodepositado se estudia mediante microscopia SEM. El fosfato de calcio electrodepositado sobre la matriz de quitosano se caracteriza mediante diferentes técnicas TEM, SEM, EDX, XRD ([ver apartado 3.2.1.3.2](#)).

3.2.3.4. Ensayos de biocompatibilidad *in vitro*

Estos experimentos se realizan gracias a la colaboración de la Dra. C. Serrano del ICMM.

3.2.3.4.1. Estudios generales de biocompatibilidad: adhesión, morfología y viabilidad

La biocompatibilidad general (*i.e.*, adhesión, morfología y viabilidad celular) de los *scaffolds* de quitosano y nanotubos de carbono con hidroxiapatita electrodepositada ha sido evaluada con osteoblastos Saos-2 siguiendo los protocolos anteriormente descritos (para más detalles, [consultar apartado 3.2.2.6.1](#)).

3.2.3.4.2. Estudios de diferenciación en osteoblastos

Como se describe en apartados anteriores, osteoblastos Saos-2 se cultivan sobre los *scaffolds* a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células por *scaffold*. Después de 5 días, unos cultivos se mantienen en medio de cultivo estándar (DMEM) y otros se incuban en medio calcificante (ODMEM). El medio ODMEM consiste en DMEM suplementado con los siguientes factores osteogénicos:

ácido ascórbico ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), β -glicerol fosfato (10 mM) y dexametasona (1mM).⁶⁰ El medio de cultivo se cambia cada 2 días. A los 7 ó 14 días, la diferenciación hacia un fenotipo más maduro en los osteoblastos en cultivo sobre los diferentes *scaffolds* se evalúa mediante estudio de la actividad fosfatasa alcalina y la formación de depósitos de calcio, parámetros ampliamente aceptados como descriptivos de un fenotipo osteoblástico más funcional hacia célula formadora de hueso.⁶¹⁻⁶²

3.2.3.4.2.1. Actividad de fosfatasa alcalina (ALP)

Los cultivos celulares se lavan primero con PBS (2 veces), para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo que pueda interferir con el ensayo. A continuación, las células se incuban con tampón RIPA para inducir la lisis celular a 4 °C durante 5 min y se raspan los pocillos de la placa con puntas de micropipeta para asegurar la rotura y separación de las células del *scaffold*. Las muestras, se recogen después en tubos de microcentrífuga y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes de cada muestra se transfieren a tubos limpios y se separan en dos fracciones: una para evaluar ALP y otra para determinar el contenido total de proteínas. Para la evaluación de ALP, se monitoriza la conversión del p-nitrofenil fosfato (pNPP) catalizada por la fosfatasa alcalina presente en las muestras. En concreto, se añaden 10 μl de la muestra a 90 μl de pNPP (10 mM en tampón 2-amino-2-metil-1-propanol 0.1 M que contiene MgSO_4 2.3 mM) y se sigue la formación de color a temperatura ambiente durante 15 min mediante absorbancia a 405 nm. Para garantizar la detección de absorbancia en un rango aceptable se realizan tres diluciones diferentes por cada muestra y se repiten los experimentos por duplicado. Los valores de absorbancia obtenidos se convierten en actividad de ALP en unidades $\cdot \text{ml}^{-1}$ y, finalmente, se normalizan por el contenido en proteínas (mg) y por superficie (cm^2). El contenido total de proteínas se mide mediante el ensayo estándar MicroLowry, en el que se usa la albúmina sérica bovina para la preparación de la recta de calibración. Así mismo, se utilizan células endoteliales como control negativo de la expresión de ALP.

3.2.3.4.2.2. Formación de depósitos de calcio

La formación de depósitos de calcio se analiza mediante el uso de la tinción Alizarín S. Brevemente, las células se fijan con formaldehído al 10% durante 10 min y luego se incuban con el reactivo Alizarín S (1% en agua destilada) durante 5 min a temperatura ambiente. Se lava el exceso de colorante con agua destilada, apareciendo los depósitos de calcio teñidos de

color rojo brillante. La tinción de los cultivos control (sobre TCP) se puede visualizar en este punto por microscopía óptica. Para cuantificar la formación de depósitos de calcio en los *scaffolds* (ya que la opacidad de estos no permite la observación por microscopía óptica), el calcio se extrae según un método previamente descrito en la bibliografía.⁶³ Adicionalmente, los depósitos extraídos se caracterizan también por EDS para obtener el valor correspondiente a la relación Ca / P de las muestras.

3.2.3.4.3. Estadística

([Ver apartado 3.2.2.6.7](#))

3.3. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ T.W. Ebbesen, “Carbon Nanotubes” *Annual Review of Materials Science* 24 (1994) 235-264.
- ² S. Iijima, “Helical microtubules of graphitic carbon” *Nature* 354 (1991) 56-58.
- ³ A.F. Hebard, “Buckminsterfullerene” *Annual Review of Materials Science* 23 (1993) 159-191.
- ⁴ S. Iijima, T. Ichihashi, “Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter” *Nature* 363 (1993) 603-605.
- ⁵ D.S. Bethune, C.H. Kiang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vasequez, R. Beyers “Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls” *Nature* 363 (1993) 605-607.
- ⁶ J.L. Hutchison, N.A. Kiselev, E.P. Krinichnaya, A.V. Krestinin, R.O. Loutfy, A.P. Morawsky, V.E. Muradyan, E.D. Obratsova, J. Sloan, S.V. Terekhov, D.N. Zakharov, “Double-walled carbon nanotubes fabricated by a hydrogen arc discharge method” *Carbon* 39 (2001) 761-770.
- ⁷ C. Journet, P. Bernier “Production of carbon nanotubes” *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 67 (1998) 1-9.
- ⁸ K.P. De Jong, J.W. Geus, “Carbon Nanofibers: Catalytic Synthesis and Applications” *Catalysis Review - Science and Engineering* 42 (2000) 481-510.
- ⁹ F. Shahidi, R. Abuzaytoun, “Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects” *Advances in Food and Nutrition Research* 49 (2005) 93-135.
- ¹⁰ T. Chandy, C.P. Sharma, “Chitosan-as a biomaterial” *Biomaterials, artificial cells, and artificial organs* 18 (1994) 1-24.
- ¹¹ P. Sorlier, C. Viton, A. Domard “Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: Role of aging” *Biomacromolecules* 3 (2002) 1336-1342.
- ¹² M. Dasha, F. Chiellinia, R.M. Ottenbriteb, E. Chiellinia, “Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications” *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- ¹³ K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan, “Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview” *Trends in Food Science and Technology* 18 (2007) 117-131.
- ¹⁴ R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S.V. Nair, H. Tamura, “Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review” *Carbohydrate Polymers* 82 (2010) 227-232.
- ¹⁵ J. Polatnick, A.J. La Tessa, H.M. Katzin, “Comparison of bovine corneal and scleral mucopolysaccharides” *Biochimica et Biophysica Acta* 26 (1957) 361-364.
- ¹⁶ M.B. Mathews, “Sodium chondroitin sulfate-protein complexes of cartilage. III.Preparation from shark” *Biochimica et Biophysica Acta* 58 (1962) 92-101.
- ¹⁷ A. Dityatev, M. Schachner, “The extracellular matrix and synapses” *Cell Tissue Res* 326 (2006) 647-654.
- ¹⁸ J. Martel-Pelletier, S. Kwan Tat, J.-P. Pelletier, “Effects of chondroitin sulfate in the pathophysiology of the osteoarthritic joint: a narrative review” *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (2010) S7-S11.
- ¹⁹ B.A. Fox, M.M. Stephens, “Glucosamine/chondroitin/primorine combination therapy for osteoarthritis” *Drugs of Today* 45 (2009) 32-45.
- ²⁰ D. Uebelhart, “Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis” *Osteoarthritis and Cartilage* 16 (2008) S19-S21.
- ²¹ C.G. Jackson, A.H. Plaas, J.D. Sandy, C. Hua, S. Kim-Rolands, J.G. Barnhill, C.L. Harris, D.O. Clegg, “The human pharmacokinetics of oral ingestion of glucosamine and chondroitin sulfate taken separately or in combination” *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (2010) 297-302.

- 22 K. Meyer, J.W. Palmer, E.M. Smyth, "On Glycoproteins: II. The polysaccharides of vitreous humors and of umbilical cord" *The Journal of Biological Chemistry* 114 (1936) 689-703.
- 23 B. Weissman, K. Meyer, "The structure of hyaluburonic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord" *The Journal of American Chemical Society* 76 (1954) 1753-1757.
- 24 J.E. Scott, C. Cummings, A. Brass, Y. Chen, "Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation" *Biochemical Journal* 274 (1991) 699-705.
- 25 J.E. Scott, "Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissue" *The FASEB Journal* 6 (1992) 2639-2645.
- 26 P. Gribbon, B.C. Heng, T.E. Hardingham, "The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association" *Biochemical Journal* 350 (2000) 329-335.
- 27 J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover" *Journal of Internal Medicine* 242 (1997) 27-33.
- 28 R. Tammi, J.A. Ripellino, R.U. Margolis, M. Tammi, "Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe" *Journal of Investigative Dermatology* 90 (1988) 412-414.
- 29 D. Kohda, C.J. Morton, A.A. Parkar, H. Hatanaka, F.M. Inagaki, I.D. Campbell, A.J. Day, "Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration" *Cell* 86 (1996) 767-775.
- 30 A. Nandi, P. Estess, M.H. Siegelman "Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44" *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 14939-14948.
- 31 A. Salustri, M. Yanagishita, C.B. Underhill, T.C. Laurent, V.C. Hascall "Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle" *Developmental Biology* 151 (1992) 541-551.
- 32 L. Sherman, J. Sleeman, P. Herrlich, H. Ponta "Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression" *Current Opinion in Cell Biology* 6 (1994) 726-733.
- 33 B.P. Toole, T.N. Wight, M.I. Tammi, "Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease" *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 4593-4596.
- 34 E. Puré, C.A. Cuff "A crucial role for CD44 in inflammation" *Trends in Molecular Medicine* 7 (2001) 213-221.
- 35 P.H. Weigel, V.C. Hascall, M. Tammi, "Hyaluronan synthases" *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 13997-14000.
- 36 E. Murano, D. Perin, R. Khan, M. Bergamin, "Hyaluronan: From biomimetic to industrial business strategy" *Natural product Communications* 6 (2011) 555-572.
- 37 H. Boedtker, P. Doty, "The native and denatured states of soluble collagen" *Journal of the American Chemical Society* 78 (1956) 4267-4280.
- 38 F.A. Johnston-Banks, "Gelatin" in "Food Gels", ed. P. Harris, Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, 1990, 233-289.
- 39 H. Boedtker, P. Doty, "A study of gelatin molecules, aggregates and gels" *Journal of Physical Chemistry* 58 (1954) 968-983.
- 40 M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-caballero, M.P. Montero "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review" *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 1813-1827.

- ⁴¹ S.M. Mithieux, A.S. Weiss, "Elastin" *Advances in Protein Chemistry* 70 (2005) 437-461.
- ⁴² L. DeBelle, A.M. Tamburro, "Elastin: molecular description and function" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (1999) 261-272.
- ⁴³ L.B. Sandberg, J.G. Leslie, C.T. Leach, V.L. Alvarez, A.R. Torres, D.W. Smith, "Elastin covalent structure as determined by solid-phase amino-acid sequencing" *Pathologie Biologie* 33 (1985) 266-274.
- ⁴⁴ B.A. Cox, B.C. Starcher, D.W. Urry "Coarcervation of alpha-elastin results in fiber formation" *Biochimica et Biophysica Acta* 317 (1973) 209-213.
- ⁴⁵ D.W. Urry, M.M. Long, R.D. Harris, K.U. Prasad, "Temperature-correlated force and structure development in elastomeric polypeptides - the Ile1 analog of the polypentapeptide of elastin" *Biopolymers* 25 (1986) 1939-1953.
- ⁴⁶ A. Ribeiro, F. J. Arias, J. Reguera, M. Alonso, J.C. Rodríguez-Cabello, "Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers" *Biophysical Journal* 97 (2009) 312-320.
- ⁴⁷ "Cipro labeling revision 04/06/2009 Supplement 073", (2009) U.S. Food and Drug Administration (FDA) http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/019537s073_020780s030lbl.pdf
- ⁴⁸ J.A. Koestner "Topics in clinical pharmacology: Ciprofloxacin: A new fluoroquinolone" *American Journal of the Medical Sciences* 297 (1989) 128-131.
- ⁴⁹ N.-X. Chin, H.C. Neu, "Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria" *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 25 (1984) 319-326.
- ⁵⁰ D. Chen, M. Zhao, G.R. Mundy, "Bone morphogenetic proteins" *Growth Factors* 22 (2004) 233-241.
- ⁵¹ S.N. Khan, J.M. Lane, "The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications" *Expert Opinion on Biological Therapy* 4 (2004) 741-748.
- ⁵² M. Geiger, R.H. Li, W. Friess, "Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2" *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003) 1613-1629.
- ⁵³ G.A.F. Roberts, J.G. Domszy "Determination of the viscometric constants for chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules* 4 (1982) 374-377.
- ⁵⁴ ASTM, F2103-01, "Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineered medical product applications", Ed. A.S.f.T. Materials, (2001).
- ⁵⁵ H.H. Winter, F. Chambon, "Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point" *Journal of Rheology* 30 (1986) 367-382.
- ⁵⁶ M.I. Pascual-Reguera, G. Pérez Parras, A. Molina Díaz, "A single spectroscopic flow-through sensing device for determination of ciprofloxacin" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 689-695.
- ⁵⁷ "Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms", (1997) U.S. Food and Drug Administration (FDA).
- ⁵⁸ J. Allen, S. Khan, M.C. Serrano, G. Ameer, "Characterization of porcine circulating progenitor cells: Toward a functional endothelium" *Tissue Engineering - Part. A* 14 (2008) 183-194.
- ⁵⁹ M.C. Serrano, R. Pagani, M. Vallet-Regí, J. Peña, J.V. Comas, M.T. Portolés, "Nitric oxide production by endothelial cells derived from blood progenitors cultured on NaOH-treated polycaprolactone films: A biofunctionality study" *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 2045-2053.
- ⁶⁰ L.A. Davis, A. Dienelt, "Embryonic Stem Cell Therapy for Osteo-Degenerative Diseases - Methods in Molecular Biology", Ed: N.I. zur Nieden, (2011), pp. 255-272.

- ⁶¹ C. He, G. Xiao, X. Jin, C. Sun, P.X. Ma, "Electrodeposition on nanofibrous polymer scaffolds: Rapid mineralization, tunable calcium phosphate composition and topography" *Advanced Functional Materials* 20 (2010) 3568-3576
- ⁶² K. Irie, S. Ejiri, Y. Sakakura, T. Shibui, T.J. Yajima, "Matrix mineralization as a trigger for osteocyte maturation" *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56 (2008) 561-567.
- ⁶³ C.A. Gregory, W.G. Gunn, A. Peister, D.J. Prockop, "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction" *Analytical Biochemistry* 329 (2004) 77-84.

IV. *SCAFFOLDS* DE QUITOSANO MINERALIZADOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. BIOMATERIALES COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Los sistemas de liberación de fármacos (DDS, *Drug Delivery Systems*) surgen con la intención de mejorar la acción de los fármacos.¹⁻² Existen ciertas desventajas asociadas al empleo de determinados fármacos ya que éstos se distribuyen en el organismo según sus propiedades físicas, tales como la solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar múltiples lugares que estén fuera de su diana terapéutica, en los que sean inactivos o en los que su acción sea indeseada o nociva y, por tanto, conlleve efectos secundarios negativos. Los sistemas de liberación de fármacos tratan de eliminar o reducir estos efectos secundarios y de liberar una concentración terapéutica del fármaco estable en el organismo.³⁻⁴

Los sistemas de liberación están formados por un principio activo y un sistema transportador cuya función es dirigir el fármaco hasta el lugar donde debe ser liberado de manera específica, en la cantidad apropiada y de manera controlada. En teoría, un DDS ideal debería modular la aplicación del principio activo (PA) en el lugar y en el momento apropiado, protegiéndolo frente a una degradación anticipada y con un patrón de liberación que se ajuste a las necesidades del tratamiento.⁵ En muchas aplicaciones se necesita disponer de sistemas que puedan ser implantados. Si éstos se prepararan a partir de materiales no degradables, el sistema soporte tiene que ser extraído una vez liberado el PA, lo que conlleva una elevada atención médica que no es deseable. Por este motivo, también se fabrican sistemas con materiales biodegradables donde el transportador, o soporte, puede degradarse después de la liberación del principio activo o durante la liberación del mismo.⁶⁻⁷

Las aplicaciones en biomateriales de este trabajo, centradas en Ingeniería de tejidos y en sistemas DDS, buscan la producción de soportes adecuados, que composicionalmente empleen materiales biocompatibles y/o biodegradables, y cuyo procesamiento permita la obtención de *scaffolds* con la estructura y morfología adecuada para cada exigencia.⁸⁻⁹ Ambos factores resultan cruciales para la liberación controlada de cualquier sustancia inmovilizada dentro de la estructura de una matriz, así como para el crecimiento de las células y tejidos.¹⁰⁻¹¹

Tradicionalmente, la ciencia y la tecnología de los biomateriales, como área interdisciplinar une conocimientos de diferentes campos como la medicina, la biología, la química y la ciencia de los materiales. La química del estado sólido también está adquiriendo importancia creciente en la ciencia de biomateriales como una herramienta útil para controlar las diversas formas

sólidas (por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, sales, co-cristales y sólidos amorfos) que se pueden inmovilizar en un soporte.¹² Así, se ha descrito como la estructura y la composición de los núcleos cristalinos, el tamaño, la textura, la agregación de las partículas y la estabilidad de las fases intermedias, pueden influir significativamente en las propiedades químicas y físicas de determinadas sustancias alterando el rendimiento final de los biomateriales.¹³⁻¹⁴ Por ejemplo, la biodisponibilidad y la higroscopicidad de determinados principios activos puede variar mucho en función de la fase sólida. Los mejores ejemplos de cómo la química del estado sólido puede controlar la formación de una forma sólida deseada se encuentran en la naturaleza.¹⁵⁻¹⁶ Huesos y dientes, por ejemplo, son tejidos biomineralizados con una estructura basada en una matriz orgánica impregnada con cristales de carboxiapatita orientados y cuya función principal es la de dar soporte al resto de tejidos blandos del cuerpo humano, y a la acción muscular.¹⁷ En general, en los procesos de biomineralización el componente orgánico hace de matriz de nucleación para el mineral inorgánico, lo que hace pensar que el proceso de nucleación se iniciaría en la superficie de contacto entre ambos.¹⁸ Sin embargo, no sólo la superficie sólida, también las moléculas solubles y las macromoléculas además de los iones orgánicos e inorgánicos, presentan un efecto importante en la cinética de la cristalización, mediante la modificación de las interacciones de los núcleos y la formación de los cristales.¹⁹⁻²⁰ En los procesos naturales, las proteínas de unión al mineral son las responsables de modular los procesos de mineralización, evitando que los iones se complejen en disolución y estabilizando las partículas precursoras para que no se aglomeren en la superficie de unión.²¹⁻²²

De particular interés en la fabricación de biomateriales sería tener el control de sistemas heterogéneos (por ejemplo, biomateriales multifuncionales gracias a la inmovilización de una o más sustancias), con una mayor interacción entre los componentes presentes. Esto determinaría un aumento significativo de la diversidad de las estructuras preparadas. En este modo, las fuerzas responsables de la auto-organización de los componentes individuales se equilibraría con las fuerzas necesarias para el ensamblaje del sistema global. Esta situación se ejemplifica en la naturaleza jerárquica e híbrida de algunos minerales biológicos, que se forman mediante una sinergia de las fuerzas que llevan a la precipitación de los componentes inorgánicos y la organización biológica.²³⁻²⁴

4.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

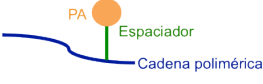

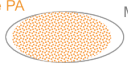
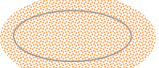
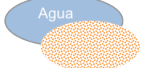
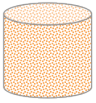
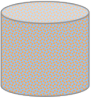
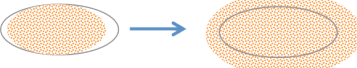
El diseño de los primeros sistemas de liberación de fármacos se centraba principalmente en el desarrollo de perfiles constantes o sostenidos de liberación, para evitar problemas asociados con la administración convencional múltiple necesaria en el tratamiento de problemas crónicos. Sin embargo, las tendencias actuales de los nuevos sistemas de liberación incluyen la optimización en la vectorización de la acción hacia los tejidos, células e incluso compartimientos subcelulares apropiados. De esta forma se pretende asegurar que el fármaco se libere paulatinamente de acuerdo a las necesidades del paciente, en el lugar requerido, con el ritmo adecuado y que al mismo tiempo además se mantenga inactivo en cualquier otro lugar del organismo.²⁵⁻²⁶ Por otra parte, la tecnología actual en liberación de fármacos intenta cubrir otras necesidades específicas como son:

- 1- Evitar problemas relacionados con la solubilidad del fármaco, es decir, conseguir una liberación lenta de PA hidrosolubles y mejorar la biodisponibilidad de los PA poco solubles en agua.
- 2- Liberar dos o más agentes en una misma formulación.
- 3- Desarrollar transportadores o soportes realmente eliminables.
- 4- Optimizar la biodistribución de los PA de metabolismo rápido o fácilmente excretables.
- 5- Controlar la liberación de PA altamente tóxicos.

Los sistemas de liberación se pueden clasificar en función de su estructura y de su mecanismo de liberación, tal y como se muestra en la [tabla 4.1](#).

Los materiales poliméricos, tanto de origen natural como sintéticos, han sido utilizados eficazmente en el diseño y desarrollo de nuevos DDS, de tal forma que han llegado a constituir uno de los aspectos claves del diseño en el amplio y multidisciplinar campo de las aplicaciones de los biomateriales.²⁷⁻²⁸ Así, mientras que muchas formulaciones tradicionales deben ser inyectadas o ingeridas, los sistemas poliméricos de liberación pueden ser localizados virtualmente en cualquier cavidad corporal, de forma que estos soportes de fármacos pueden situarse en el organismo cerca de la zona enferma (implantados, o en la piel de forma externa) ([Fig. 4.1](#)). Gracias a ello han aparecido nuevas rutas posibles de administración de fármacos. En principio, sus mecanismos de liberación son similares a los de otras rutas, y se basan en la disolución y difusión de los fármacos, sin embargo, deben tenerse en cuenta algunos aspectos fisiológicos y anatómicos (pH, enzimas, etc.).

Tabla 4.1. Tipos de DDS y sus principales características.²⁹

Tipo de DDS	Estructura y mecanismo de liberación	Tipo de control de liberación	Biodegradabilidad, resorbabilidad	Ejemplos clínicos
Conjugados polímero-PA	<p>- <i>Sistemas de extremo de cadena</i></p>  <p>- <i>Sistemas de cadena lateral</i></p> 	Químico	<p>Hidrosoluble (y/o biodegradable)</p> <p>Residuo hidrosoluble (y/o biodegradable)</p>	<p>Pegilación de proteínas</p> <p>SMANCS®</p> <p>Conjugados HPMA</p>
Sistemas de membrana	 <p>Membrana polimérica</p>	<p>- Difusión de PA</p>  <p>- Osmótico</p> 	<p>La membrana puede ser biodegradable</p> <p>Membrana no biodegradable</p>	<p>Ocusert®</p> <p>Progestasert®</p> <p>Sistemas transdérmicos</p> <p>Sistemas OROS®</p>
Sistemas monolíticos	 <p>Matriz polimérica</p>	<p>- Difusión de PA</p> <p>- Difusión/erosión</p> <p>- Erosión</p>	<p>Matriz no biodegradable</p> <p>Matriz biodegradable</p> <p>Matriz biodegradable</p>	<p>Algunos DDS orales</p> <p>Sistemas PLGA</p>
Matrices hidrofílicas (Hidrogeles)	 <p>Agua</p> <p>Matriz polimérica</p>	<p>- Controlado por hinchamiento</p> <p>- Entrada de agua</p> <p>- Controlado por disolución</p>		
Sistemas sensibles a estímulos		Estímulos		

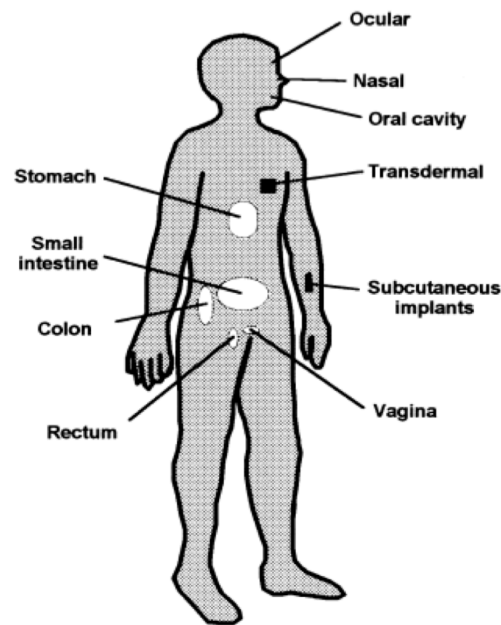


Figura 4.1. Localización de los tejidos en los que se puede aplicar un sistema de liberación de fármacos.

Desde el punto de vista de la interacción soporte-PA hay dos tipos generales de sistemas: aquellos en los que el PA está unido covalentemente y aquellos en los que el PA se encuentra disperso en el mismo.³⁰⁻³¹ El segundo grupo de sistemas ha recibido gran atención en el campo de la tecnología farmacéutica con fines de protección del PA, mediante encapsulación con azúcares, polisacáridos y polímeros sintéticos o por inclusión del propio PA en una matriz polimérica continua. Entre estos sistemas de liberación se pueden incluir los *hidrogeles*, unos sistemas muy atractivos para aplicaciones biológicas por su elevado contenido en agua y su biocompatibilidad. En las últimas décadas, se han obtenido notables progresos en la síntesis y en el uso de los hidrogeles en el campo biomédico, donde se han utilizado como vehículos para inmovilizar, encapsular y liberar de manera controlada un gran número de sustancias con actividad fisiológica (antibióticos, anticoagulantes, antineoplásicos, anticuerpos, anticonceptivos).³² En su uso como sistemas de liberación de fármacos se han descrito numerosos tipos de liberación de PA desde hidrogeles como se ilustra en la [figura 4.2](#).³³

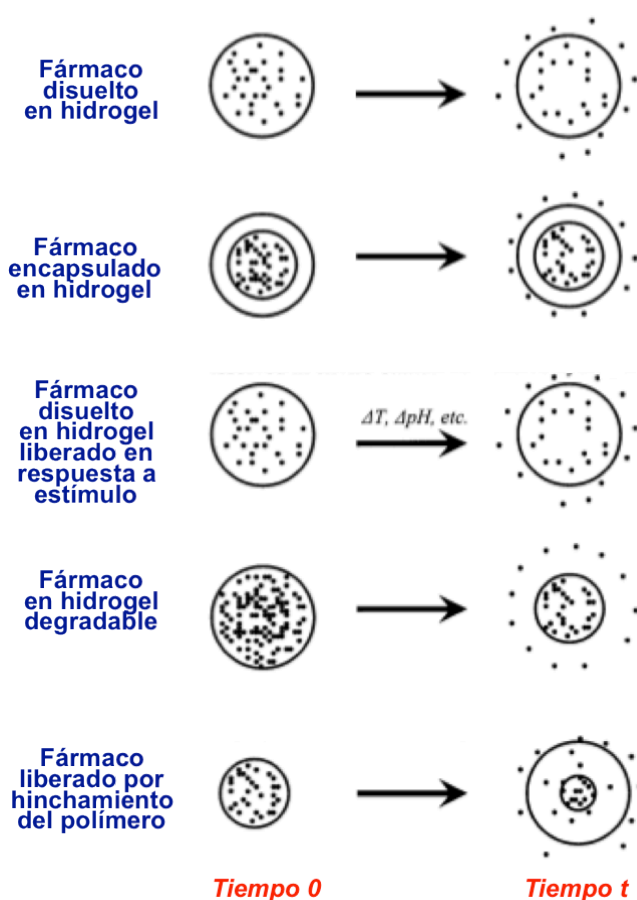


Figura 4.2. Distintos tipos de liberación de un fármaco desde un hidrogel.

Como se describe en la [tabla 4.1](#), los sistemas de liberación en hidrogeles están controlados por la entrada de agua al sistema (excluyendo los sistemas osmóticos), generando el hinchamiento o la disolución de la matriz. En estos sistemas controlados por hinchamiento, la matriz es inicialmente un polímero vítreo que se hincha en agua o en fluidos fisiológicos. El soporte macromolecular sufre entonces una transición vítrea debida al agua, y se forma un material tipo hidrogel. El PA, previamente incorporado, difunde a través del polímero hinchado, mientras que el frente de penetración del agua es el que define y controla la liberación de PA. En consecuencia, los hidrogeles son materiales con un excelente potencial para aplicaciones biomedicas, puesto que sus características físicas (grado de hidratación, porosidad, densidad de entrecruzamiento, resistencia mecánica, etc.) pueden alterarse y controlarse fácilmente, con el fin de modificar la velocidad de liberación de un PA determinado. En los sistemas controlados por la disolución de la matriz, la entrada de agua controla la disolución del soporte. Los PA de baja solubilidad en agua o macromoleculares pueden ser liberados de forma controlada por este mecanismo. La solubilización de estas estructuras macromoleculares puede llegar a ser un proceso muy lento porque la matriz debe sufrir antes un desplegamiento (si es semicristalina) y un desenmarañamiento de las cadenas.

4.1.3. SCAFFOLDS DE QUITOSANO MINERALIZADOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE CFX

Como se ha mencionado anteriormente ([ver apartado 3.1.1.2.1](#)), el quitosano es un polímero natural, biodegradable y con diferentes aplicaciones en la industria alimenticia, biotecnológica y farmacéutica. Debido a su carácter policationico es un polímero natural soluble en medios acuosos ácidos. Una de las características más interesantes del quitosano es su capacidad para formar hidrogeles, lo que ha despertado gran interés debido a su potencialidad en aplicaciones biomédicas.³⁴⁻³⁵ La gran demanda de *scaffolds* para Ingeniería de tejidos ha promovido el interés por la mineralización biomimética de los hidrogeles. En particular, se conoce que los fosfatos de calcio son los principales componentes inorgánicos de los tejidos biológicos duros, como huesos y dientes. En la naturaleza, existen diferentes formas de fosfato de calcio cuya estructura depende de la temperatura, la humedad y la presencia de impurezas. Entre éstas, la forma más estable es la hidroxiapatita (HAp), mientras que el fosfato de calcio amorfo (ACP) se considera como una fase transitoria durante la formación de fosfatos de calcio en solución acuosa. Por lo general, el ACP es la primera fase que precipita de una solución sobresaturada

que contiene cationes de calcio y aniones de fosfato, y es el precursor de apatita biológica durante la formación de hueso.³⁶⁻³⁷

En la literatura se había descrito una metodología para la preparación de hidrogeles monolíticos de quitosano mediante la neutralización de las soluciones de quitosano.³⁸ Esta metodología se basa en generar, *in situ* y gradualmente, una base a partir de una fuente alcalina (urea) disuelta uniformemente en la solución polimérica. Frente a una hidrólisis térmica tradicional de urea (a 90 °C), en este caso se usa como catalizador un enzima específico (ureasa) que permite trabajar a bajas temperaturas (entre 4 y 37 °C) con un mayor control de la generación de amonio. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo como se indica en la [figura 4.3](#).

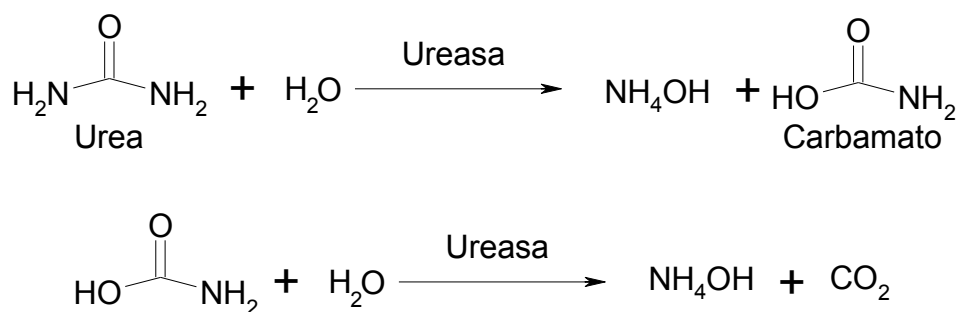


Figura 4.3. Reacción de hidrólisis de la urea mediante ureasa.

Recientemente se ha demostrado la idoneidad de este proceso enzimático de gelificación de quitosano con ureasa en combinación con el proceso ISISA ([ver apartado 1.2](#)), para la preparación de *scaffolds* de quitosano con distintos tipos de cristales inmovilizados en forma sólida.³⁹⁻⁴⁰ En este apartado se presenta un estudio de preparación y caracterización de estructuras tridimensionales multifuncionales de quitosano que contienen inmovilizados cristales anhidros de CFX y sales de fosfato de calcio amorfo (ACP), donde el primer tipo de cristal puede evitar cualquier infección quirúrgica resultante de la implantación del *scaffold* y el segundo puede promover la regeneración de tejido óseo y los procesos de precipitación de fosfato de calcio. En particular, se describe cómo el gradual aumento del pH del medio acuoso, resultante de la descomposición enzimática de la urea, promueve la gelificación del quitosano y al mismo tiempo la precipitación de los cristales de CFX y ACP. Este sistema permite la formación de *scaffolds* híbridos, caracterizados por la presencia de un polímero (quitosano) donde se embeben tanto componentes orgánicos (cristales de CFX) e inorgánicos (cristales de ACP). Antes de preparar los *scaffolds*, se efectúa un estudio previo relativo a la co-precipitación de los cristales de CFX y ACP en una solución acuosa sin quitosano. A

continuación, se preparan los hidrogeles y se procesan mediante la metodología ISISA para lograr los *scaffolds* macroporosos de quitosano con CFX y ACP, que se caracterizan como sistemas de liberación controlada.

En la [tabla 4.2](#) se resumen las muestras preparadas en este trabajo.

Tabla 4.2. Muestras preparadas en este trabajo.

ADITIVO	Cantidad de ureasa (μL)		
	125	150	175
---	Q125	Q150	Q175
<i>Fosfato de calcio</i>	QP125	QP150	QP175
<i>CFX</i>	QX125	QX150	QX175
<i>Fosfato de calcio+CFX</i>	QPX125	QPX150	QPX175

4.2. ESTUDIO DE SOLUBILIDAD DE LOS CRISTALES DE CFX

La solubilidad de los cristales de CFX en disoluciones acuosas varía considerablemente en función de si se encuentran en su forma anhidra o en su forma hidratada.⁴¹ Así, la solubilidad de los cristales de CFX anhidros es alta, mientras que, la de los de CFX en su forma hidratada es muy baja.⁴² En las micrografías SEM ([Fig. 4.4](#)) se observa que el CFX (materia prima) presenta cristales amorfos, de tamaño heterogéneo y con forma de aglomerados. En cambio, al observar el CFX liofilizado dos veces se aprecian cristales, en forma de aguja, de un tamaño menor y más homogéneo.

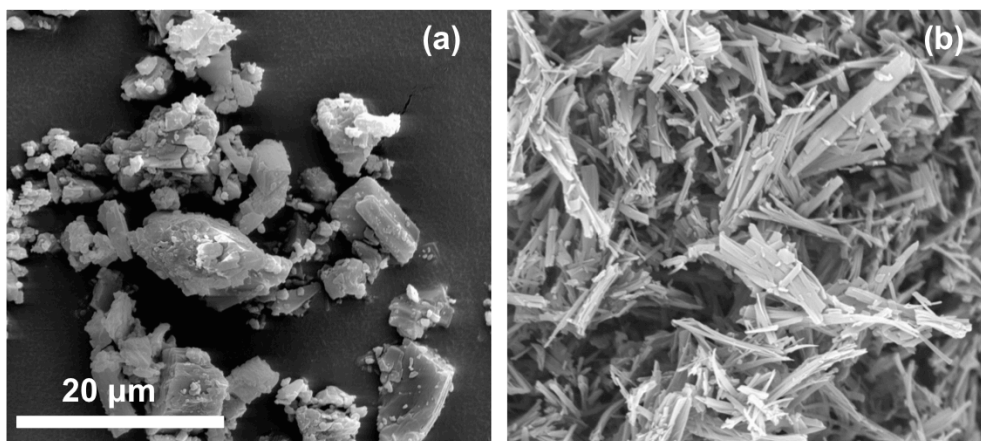


Figura 4.4. Micrografías SEM de CFX: (a) sin tratar (Normon) y (b) liofilizado dos veces.

El diagrama de difracción de rayos X (Fig. 4.5) muestra que el CFX liofilizado dos veces está en su forma anhidra, lo que determina una mayor solubilidad que el CFX sin tratar. Por este motivo se decide trabajar con CFX liofilizado dos veces. Hay que destacar que la solubilidad de CFX liofilizado es notablemente mejor, pero no es excelente, debido al tamaño (relativamente grande) de los cristales. Esto hace complicado tener disoluciones concentradas de CFX en agua, a menos que estas disoluciones sean ácidas.⁴³ Por este motivo se decide disolver el CFX directamente en ácido acético para la preparación de los *scaffolds* (ver apartado 3.2.1.4).

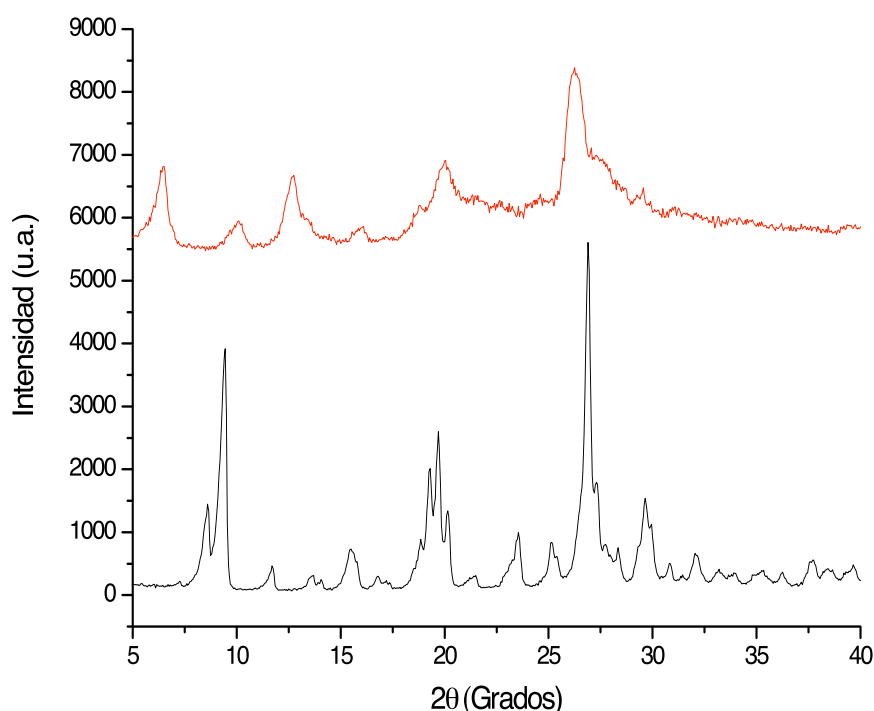


Figura 4.5. Patrón representativo DRX de CFX en su forma anhidra (rojo) e hidratada (negra).

4.3. ESTUDIOS DE PRECIPITACIÓN DE FOSFATO DE CALCIO Y CFX EN DISOLUCIÓN SIN QUITOSANO

Como se comentó anteriormente, el aumento de pH, resultante de la descomposición de la urea en presencia de ureasa, induce, además de la gelificación del quitosano, la precipitación de los cristales de ciprofloxacino y fosfato de calcio. Con el objetivo de examinar en detalle la precipitación de estos componentes se realizan estudios preliminares en disoluciones sin quitosano.

4.3.1. PRECIPITACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL FOSFATO DE CALCIO

En el caso particular del fosfato de calcio amorfo (ACP) el objetivo es determinar las condiciones experimentales necesarias para estabilizarlo, debido a su fuerte tendencia a convertirse en HAp (hidroxiapatita) mediante disolución y re-cristalización.⁴⁴

Esta situación, es especialmente crítica en un medio complejo con componentes que interaccionan (como por ejemplo, CFX y quitosano) ya que, en su evolución (como la precipitación en el primer caso, y la gelificación y el aumento de viscosidad en el segundo), pueden desestabilizar la formación de ACP. Por otra parte, la gelificación del quitosano, con la formación de un sistema muy viscoso, representa una ulterior dificultad en el proceso de aislamiento (y de caracterización) del precipitado.⁴⁵ Para obviar a estas dificultades, se hacen unos primeros estudios induciendo la precipitación de fosfato de calcio en disolución acuosa (o sea, en ausencia de CFX y de quitosano) mediante hidrólisis de urea con ureasa, a 4 y 37 °C.

En primer lugar, se realiza un estudio de la evolución de la formación de los cristales en una disolución de hidroxiapatita/urea en presencia de ureasa, a 4 °C ([ver apartado 3.2.1.3](#)). Trabajando a 4 °C la cinética de reacción es lenta y esto permite seguir la variación de pH en el tiempo. Aislando el precipitado a distintos valores de pH, se estudia mediante microscopía TEM la morfología de las nanopartículas precipitadas. En general, los cristales de ACP y HAp presentan una morfología muy diferente: ACP se presenta con tamaño nanométrico y forma granular (dado su carácter amorfo), mientras que los cristales de HAp se presentan como agregados nanométrico laminares con aspecto parecido a “flores”. Efectivamente se observa que, a 4 °C, sólo se pueden estabilizar los precipitados de ACP cuando el pH se mantiene por debajo de 6.5, de lo contrario, se obtienen cristales de HAp ([Fig. 4.6-a/b](#)). De modo analogo, se realiza un estudio equivalente a 37 °C y se observa que, en esta disolución, el aumento de temperatura favorece la formación de HAp con respecto a ACP también por debajo de pH=6.5 ([Fig. 4.6-c/d](#)).

Con el fin de comprobar la naturaleza cristalina de los agregados precipitados se realizan análisis de difracción de electrones en área seleccionada (SAED) y de difracción de rayos X (XRD). Como se esperaba, el patrón SAED de ACP (obtenida a 4 °C, pH=6.5) no revela ningún orden cristalográfico mientras que el SAED de HAp (obtenido a 4 °C, pH=7.0) muestra el patrón de anillos punteados característico para muestras de hidroxiapatita policristalina corroborado en el espectro de difracción de rayos X ([Fig. 4.7](#)). En este, la presencia del pico centrado en $2\theta = 31.7^\circ$, para el precipitado obtenido a 4 °C y pH=7.0, revela la formación de HAp de acuerdo con la ficha JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*, ficha

JCPDS 09-0432). Hay que tener en cuenta que la baja temperatura utilizada para la síntesis de HAp (4 °C) no permite obtener un patrón SAED adecuado para poder asignar con exactitud los planos cristalinos.

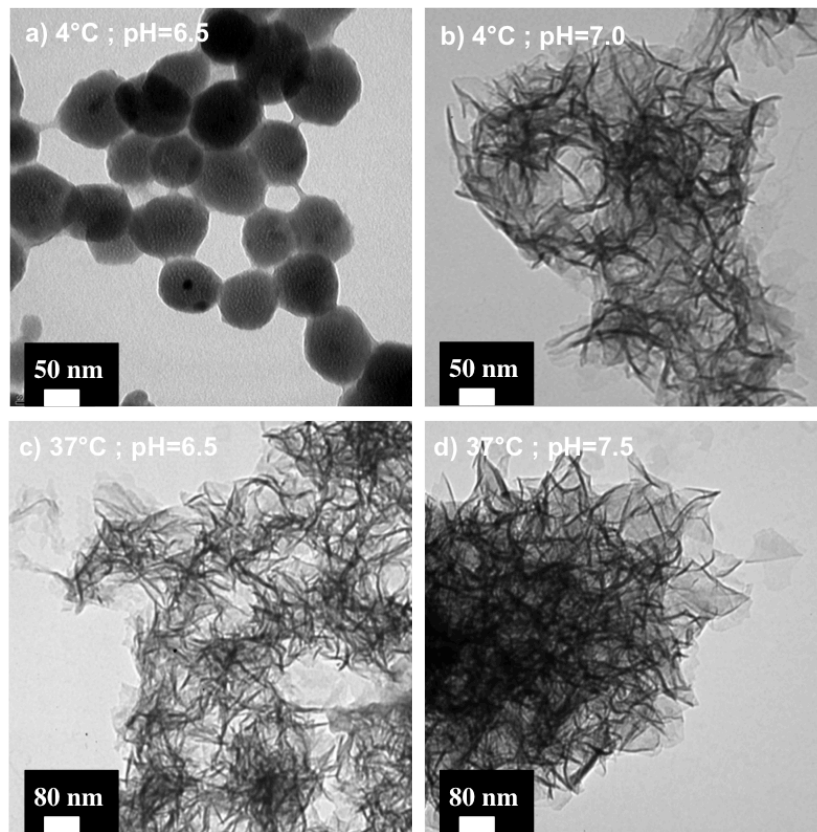


Figura 4.6. Micrografías TEM de los precipitados de fosfato de calcio obtenidos a través de la descomposición de urea mediante ureasa, a 4 y 37 °C. El pH final varía de 6.5 (a,c) a 7 y 7.5 (b,d).

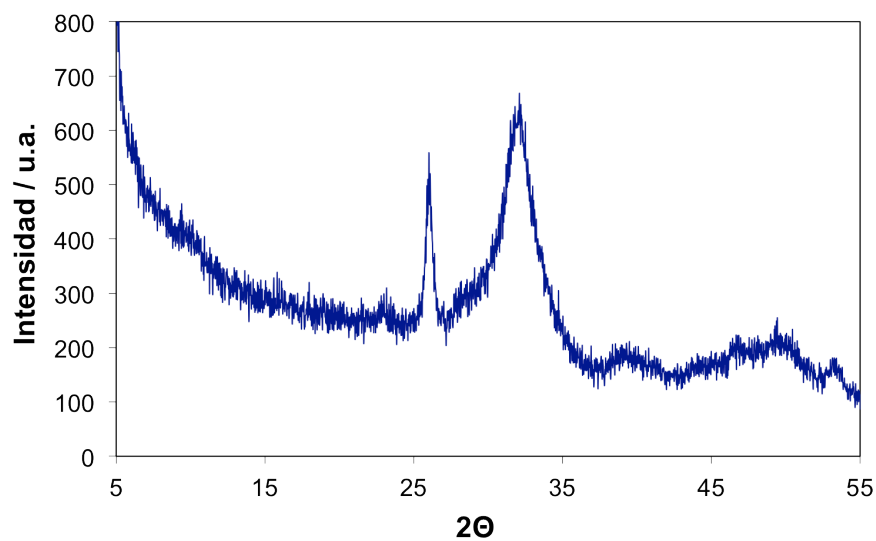


Figura 4.7. Diagrama DRX del precipitado de fosfato de calcio obtenido a través de la descomposición de urea mediante ureasa, a 4 °C y pH=7.0.

El espectro RMN de sólido (^1H RMN) confirma la formación de HAp (Fig. 4.8). Así, el espectro del precipitado presenta la banda centrada en 0 ppm, características de los grupos hidroxilo de HAp. Las condiciones experimentales específicas necesarias para la formación de ACP revelan la importancia en el uso de la ureasa para la descomposición suave de la urea. Merece la pena señalar, como se mencionó anteriormente, que la descomposición de urea en ausencia de ureasa sólo ocurre a valores de temperatura cercanos a 90 °C, determinando así un fuerte aumento del pH con la formación de HAp en los primeros precipitados.⁴⁶

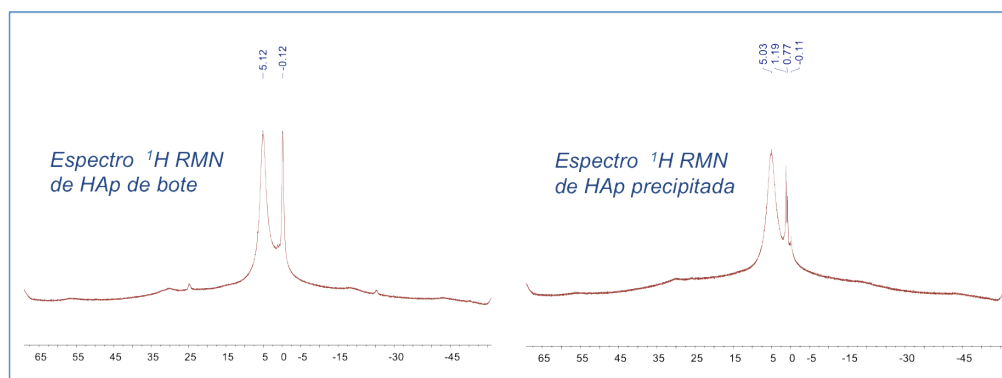


Figura 4.8. Espectros ^1H -RMN de HAp de bote (izquierda) y de HAp obtenida por precipitación en disolución (derecha).

4.3.2. PRECIPITACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ACP-CFX

De forma análoga al estudio aislado de precipitación de ACP, por simplicidad también se estudia la co-precipitación de fosfato de calcio y CFX en solución acuosa (sin quitosano). En primer lugar, se estudia una disolución de CFX en ausencia de fosfato de calcio. Mediante TEM se observa la heterogeneidad del medio y la morfología de los cristales de CFX con forma de aguja también a 4 °C y a valores de pH=4.6 (Fig. 4.9).

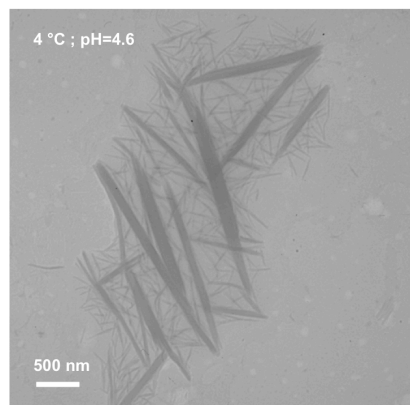


Figura 4.9. Micrografía TEM de los cristales de CFX obtenidos a través de la descomposición de urea mediante ureasa, a 4 °C a pH=4.6.

A continuación, se estudia una disolución de CFX en presencia de fosfato de calcio. Los resultados muestran que la presencia de cristales CFX ayuda a estabilizar la formación de ACP, no sólo en un intervalo de valores de pH más amplio (hasta 7.5 a 4 °C, Fig. 4.10-a), sino también a valores de temperatura más elevados (hasta 37 °C a pH=7.0, (Fig. 4.10-b) con respecto a los estudios mostrados anteriormente (ver apartado 4.3.1). Los resultados sugieren que la estabilización en la formación de ACP depende del crecimiento preferencial de los cristales de CFX en forma de aguja, cuya superficie (como cualquier otra superficie 2D) restringe el crecimiento de ACP y estabiliza este precipitado metaestable de fosfato de calcio.

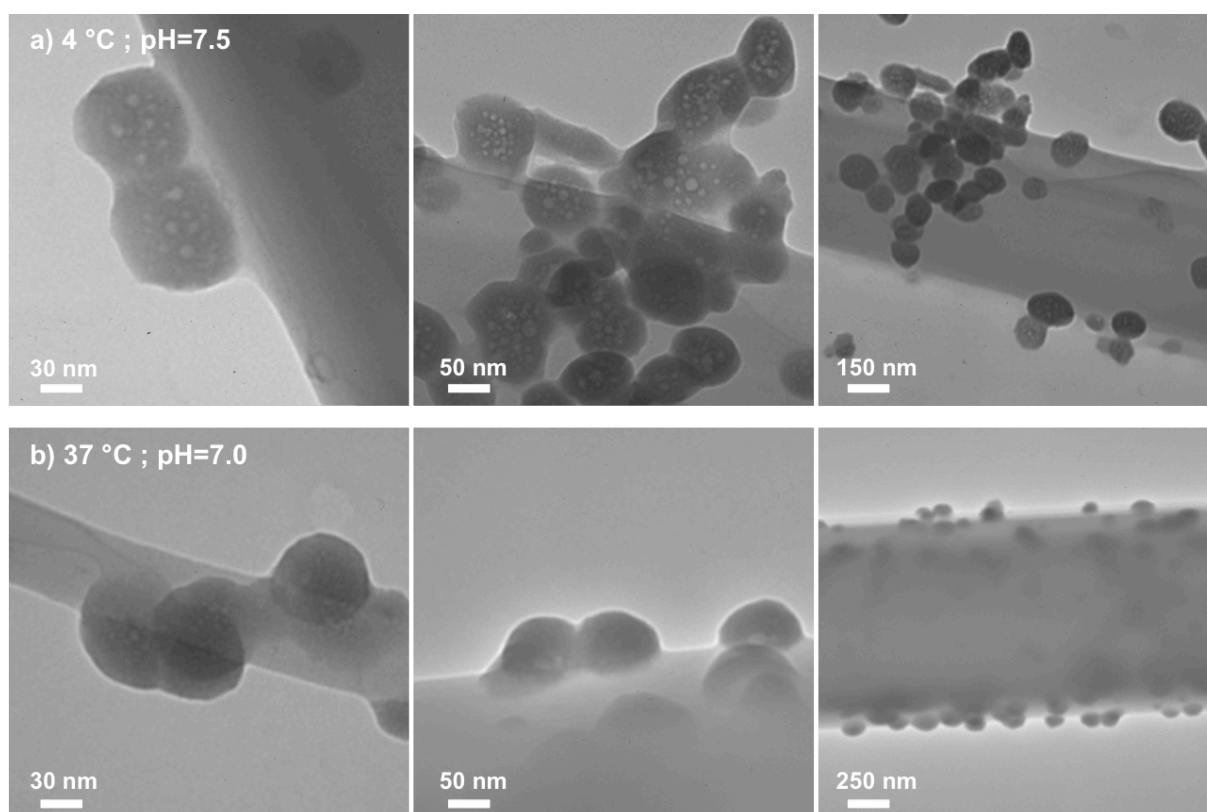


Figura 4.10. Micrografías TEM del fosfato de calcio de tipo granular (ACP) sobre los cristales de CFX obtenidos por precipitación mediante descomposición de urea inducida enzimáticamente [a)4°C - pH=7.5; b)37°C - pH=7.0].

Los espectros RMN de sólido confirman la formación preferente de ACP con respecto a HAp en presencia de CFX (Fig. 4.11). El espectro ^{31}P MAS RMN de sólido presenta una banda ancha centrada en 2.8 ppm que, típicamente, se atribuye a los grupos PO_4^{3-} del fosfato de calcio amorfo o de baja cristalinidad (Fig. 4.11-a).^{47,48} La formación preferente de ACP frente a HAp se demuestra mediante el espectro ^1H NMR. Donde se observa que el precipitado apenas

presenta la banda centrada en 0 ppm (Fig. 4.11-b), característica de los grupos hidroxilo de HAp (Fig. 4.11-c).⁴⁹

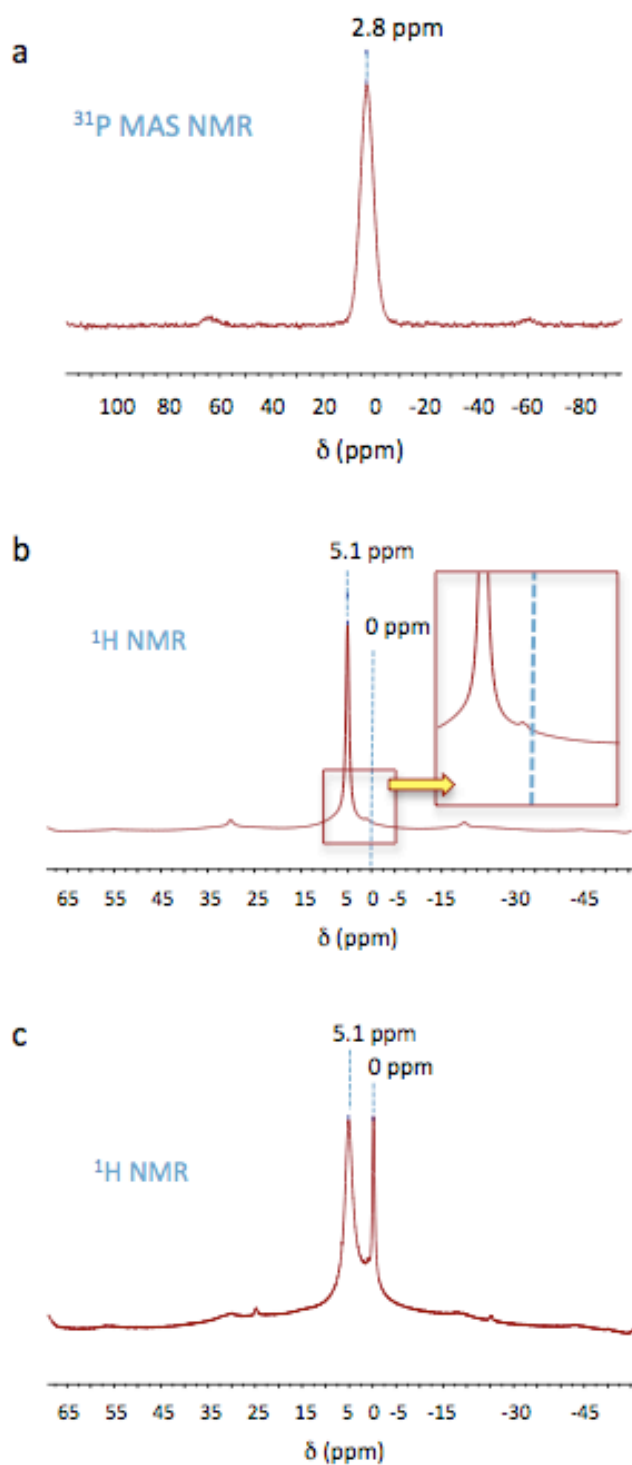


Figura 4.11. Espectros ^{31}P MAS RMN (a) y ^1H RMN (b) de ACP precipitado sobre cristales de CFX. También se incluye el espectro de ^1H RMN (c) de cristales de HAp comercial para una mejor comparación.

El análisis EDX de estas estructuras confirma que sobre la superficie cristalina de CFX precipita ACP. Mediante EDX, conforme a su composición, se detecta carbono, oxígeno y flúor en los cristales a forma de aguja de CFX (ver fórmula molecular en apartado 3.1.2.1). Por otro lado, en los precipitados de tipo granular depositados sobre estos cristales de CFX se detecta calcio y fósforo (Fig. 4.12).

A pesar de la heterogeneidad del medio acuoso, la ausencia de elementos extraños en ambos tipos de cristales, aciculares y granulares, confirma que la precipitación es el resultado bien definido de fases separadas.

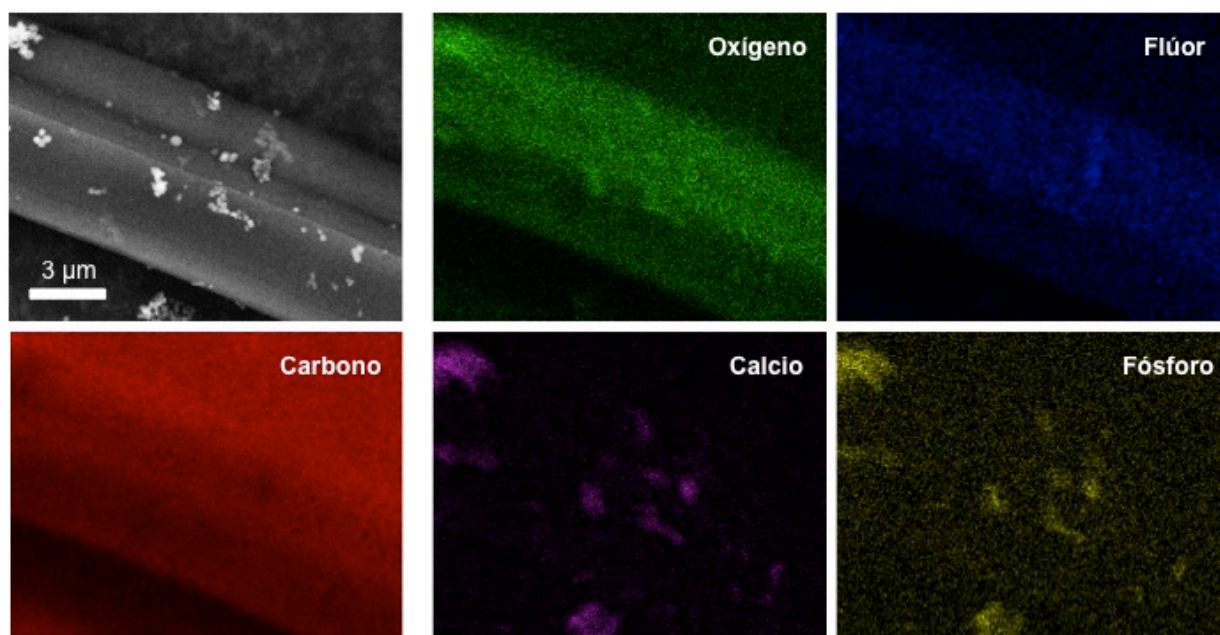


Figura 4.12. Micrografía SEM y análisis EDX en los precipitados obtenidos mediante descomposición de urea con ureasa (4°C y pH=8.0) para confirmar la presencia de fosfato de calcio de tipo granular precipitado sobre los cristales de CFX en forma de “agujas”.

4.4. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL HIDROGEL

En esta etapa, se estudia mediante análisis reológico la formación de los hidrogeles de quitosano acompañada por la precipitación del fosfato de calcio y CFX. En particular, la lenta generación de base proporcionada por hidrólisis de la urea, promueve el aumento gradual del pH que causa la precipitación de los dos componentes añadidos, junto con la gelificación del quitosano. Con el fin de comprender el proceso de gelificación de las distintas disoluciones de quitosano se evalúan los módulo elástico (G') y viscoso (G'') en función del tiempo. En general, la gelificación es una transición gradual de un líquido a un sólido viscoelástico que se

puede seguir mediante la medición de las propiedades reológicas. La tendencia general en los procesos de gelificación, es que G'' sea mayor que G' , ya que en estado líquido dominan las propiedades viscosas. Pero tras la gelificación, debido al entrecruzamiento (ya sea químico o físico) propio de la formación de la red que caracteriza el estado de gel, las propiedades elásticas dominan sobre las viscosas, haciendo que G' aumente proporcionalmente más que G'' . Bajo estas circunstancias, los valores de G' y G'' se cruzan en un tiempo que se define como tiempo de gelificación (*gel point*).⁵⁰ El punto de gel es uno de los parámetros físicos más importantes del proceso de gelificación, que se caracteriza por la aparición en el sistema reactivo de una macromolécula con un peso molecular infinitamente grande. De este modo, estudiando los tiempos de gelificación para las distintas muestras, se evalúa si la presencia de los componentes (fosfato de calcio, CFX o ambos) en la disolución de quitosano determina una variación en los correspondientes tiempos de gelificación. La [figura 4.13](#) muestra los perfiles del modulo elástico (G') y viscoso (G'') en función del tiempo en la proximidad del punto de gel, para las distintas disoluciones de quitosano: Q175, QP175, QX175 y QPX175. Todos los estudios de reología ilustrados en este párrafo se han realizado empleando 45U/mL de ureasa ([ver apartado 3.2.1.5.3](#)).

Como se esperaba, inicialmente G'' es más grande de G' debido a que la muestra se encuentra todavía en estado líquido y, por tanto, dominan las propiedades viscosas. Cuando las disoluciones empiezan a aproximarse al estado gel, por la formación gradual de una red, ambos módulos aumentan. Sin embargo, al aumentar proporcionalmente G' ($\Delta G'/dt$) más que G'' , se observa el punto de cruce entre G' y G'' , o tiempo de gelificación (*gel point*). En la [figura 4.13](#) se muestra claramente como las distintas disoluciones presentan diferentes *gel points*. En particular, la disolución que presenta el tiempo de gelificación más rápido es la que sólo contiene quitosano (Q175). Curiosamente, la disolución QPX175, quitosano en presencia tanto de fosfato de calcio como de CFX, presenta un tiempo de gelificación intermedio entre QX175 y QP175, es decir, de las disoluciones que contienen los componentes por separado. Este fenómeno se puede explicar teniendo en cuenta los precedentes estudios en disolución. La presencia de CFX o del fosfato de calcio, en las correspondientes disoluciones, retrasa la gelificación del quitosano. La contemporánea presencia de los dos componentes favorece un mayor aumento del pH que determina una gelificación más rápida del quitosano con una precipitación más rápida también del fosfato de calcio, que tiende a formarse sobre los cristales de CFX.

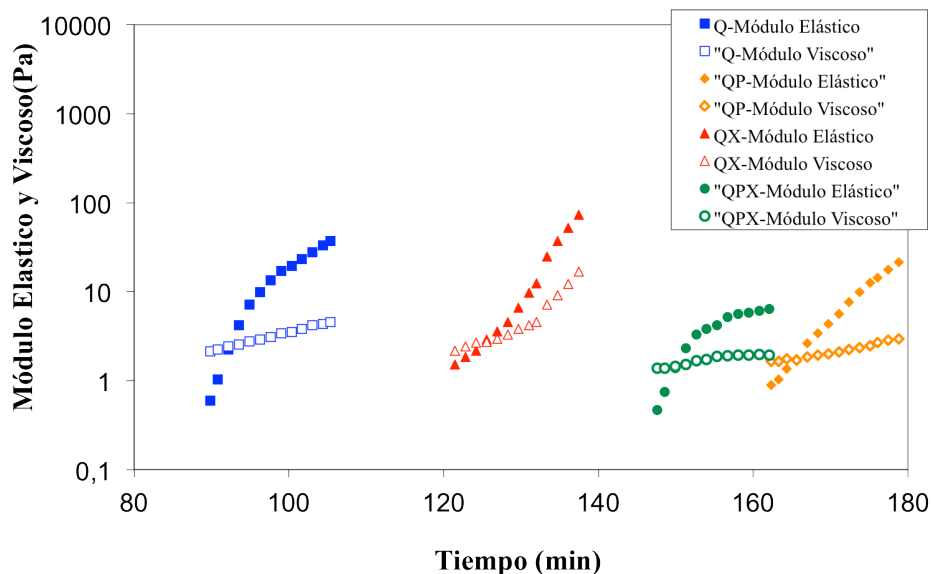


Figura 4.13. Módulos elástico (G') y viscoso (G'') cerca del *gel point*, a 1 Hz (QPX, círculos; QX, triángulos; QP, diamantes; Q, cuadrados). El tiempo de gelificación se determina en la intersección de G' y G'' .

Otro aspecto interesante relativo a la formación de los hidrogeles se evidencia representando por completo las curvas de los módulos elástico y viscoso en función del tiempo (Fig. 4.14). En todos los casos se observa que las curvas presentan dos puntos de inflexión después del punto de gelificación.

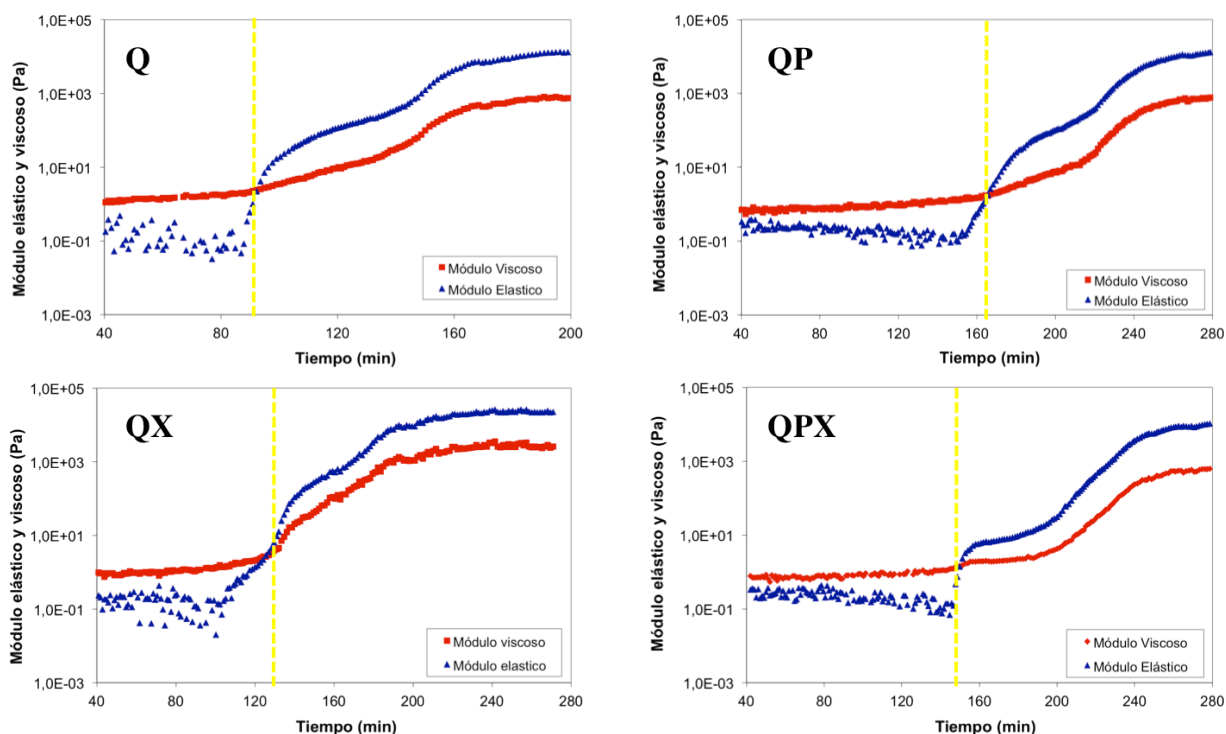


Figura 4.14. Módulos elástico, G' (curva azul), y viscoso, G'' (curva roja), a 1 Hz para distintos hidrogeles (Q; QX; QPX; QP).

Esta variación reológica corresponde, experimentalmente, a las distintas etapas de la formación del hidrogel, como se ilustra en la [figura 4.15](#).

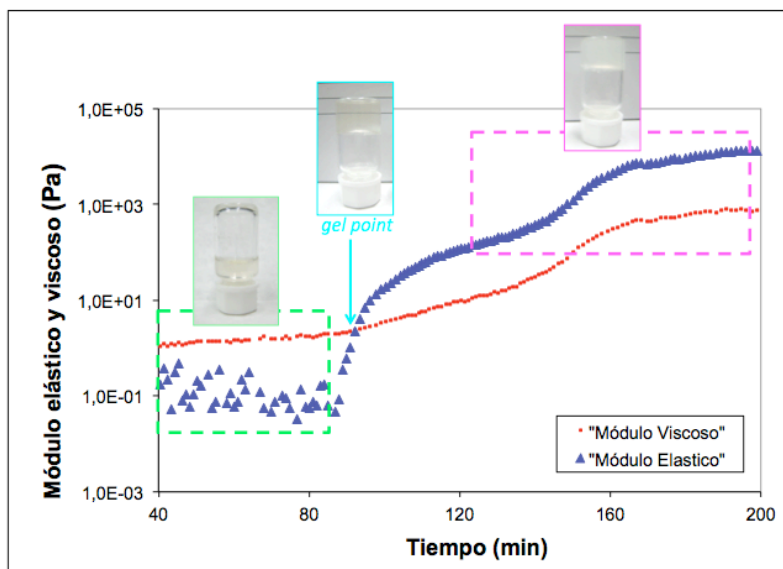


Figura 4.15. Módulo elástico y viscoso de la muestra de solo quitosano (Q) durante el proceso de la formación del hidrogel e imágenes relativas a la formación del hidrogel en las distintas fases.

Por simplicidad, se puede describir el proceso de formación de los hidrogeles de quitosano en tres etapas distintas. En una primera etapa, antes del punto de gelificación, prevalece el estado líquido. En la segunda, en correspondencia con el punto de gelificación, se obtiene la formación del hidrogel de quitosano, que aparece transparente y muy blando. En la tercera etapa, una mayor interacción de las cadenas del polímero lleva a la formación de un hidrogel de quitosano opaco y más resistente.

Inicialmente, la hidrólisis de la urea en presencia de ureasa favorece la formación de NH_4OH que determina un aumento del pH de 5.3 a 6.2, valor de pH al cual el quitosano es todavía soluble en disolución. Esta etapa inicial corresponde a un valor de G' más bajo de G'' . Posteriormente, la continua producción de NH_4OH determina un aumento del pH por encima de 6.2 que conduce a la formación de un gel de quitosano hidratado como precipitado. Esta precipitación, o formación del gel, es debida a la neutralización de los grupos aminos del quitosano y la consiguiente eliminación de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre cadenas que posteriormente permite la extensiva formación de los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrófobas entre cadenas.⁵¹ El repentino aumento del módulo elástico (G') se atribuye a la rápida formación inicial de la red, facilitada por la alta concentración de reactivos, incluyendo el quitosano. Efectivamente, la formación de aglomerados de cadenas de quitosano

determina el aumento de la viscosidad de la disolución. Rápidamente estos aglomerados forman redes, con un aumento significativo del módulo elástico (G'). El segundo punto de inflexión de la curva G' depende de la reorganización de las cadenas en el gel, que se manifiesta con un aumento de la turbidez, hasta llegar a un estabilidad del módulo elástico, debido al agotamiento de los reactivos en disolución. Resumiendo, la disolución de quitosano, trasparente en un principio, en presencia de urea y ureasa se convierte progresivamente en un gel más viscoso, hasta la formación de un gel muy denso y opaco. El aumento de la turbidez, y de la viscosidad, son consecuencia del aumento del pH debido a la progresiva formación de NH_4OH por hidrólisis enzimática de la urea (Fig. 4.16).

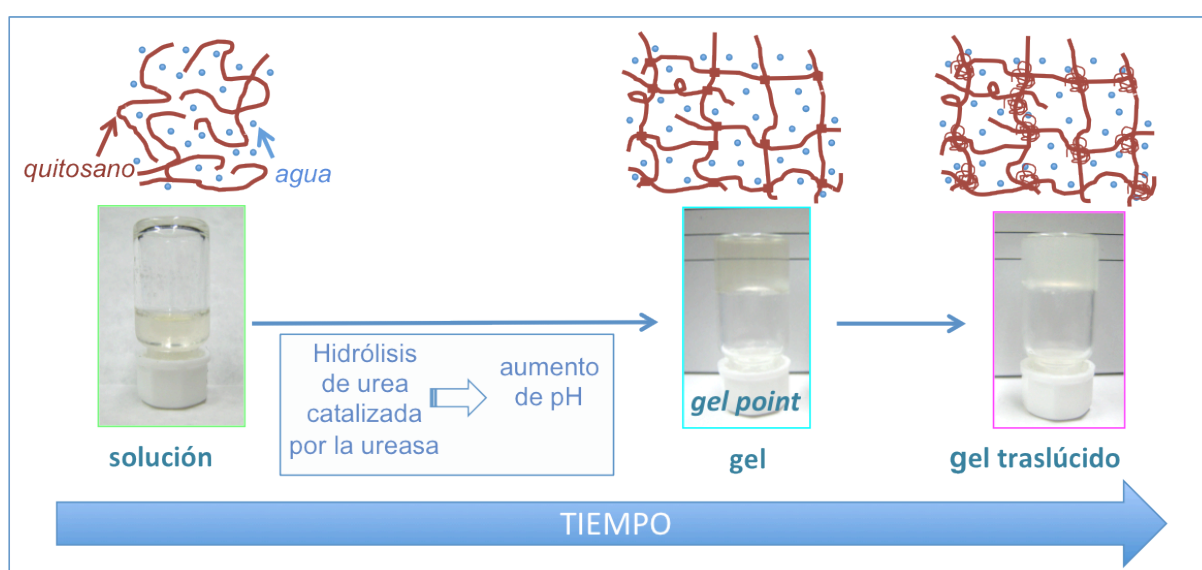


Figura 4.16. Esquema de la formación del hidrogel de quitosano por hidrólisis de urea catalizada por ureasa.

Aunque la estrategia comúnmente usada para la determinación del tiempo de gelificación se basa en la determinación del punto de intersección entre los módulos elástico y viscoso, esta es solo una aproximación. Para tener un enfoque más riguroso, se suelen realizar experimentos en multifrecuencia (criterio de Winter-Chambon). Según este método, el tiempo de gelificación se determina registrando la variación de $\tan(\delta)$ en función del tiempo a distintas frecuencias, ya que $\tan(\delta)$ es independiente del *gel point*. Un método más general para determinar el punto de gel se basa en la observación de que esta condición en $\tan\delta$ ($\tan\delta = (G''/G')$) es independiente de la frecuencia.⁵² Superado el punto de gelificación $\tan(\delta)$ disminuye gradualmente con el tiempo, debido a un mayor aumento de G' respecto a G'' por la formación del gel. El punto de intersección de las pérdidas de $\tan(\delta)$ en función del tiempo a distintas frecuencias permite identificar el punto de gelificación.

En la [figura 4.17](#) se muestra la variación de $\tan(\delta)$ con el tiempo registrada a distintas frecuencias (0.5, 0.8 y 1 Hz) para la muestra QX. Se evidencia que el tiempo de gelificación determinado mediante $\tan(\delta)$ se corresponde con el tiempo determinado por la intersección de los perfiles de G' y G'' .

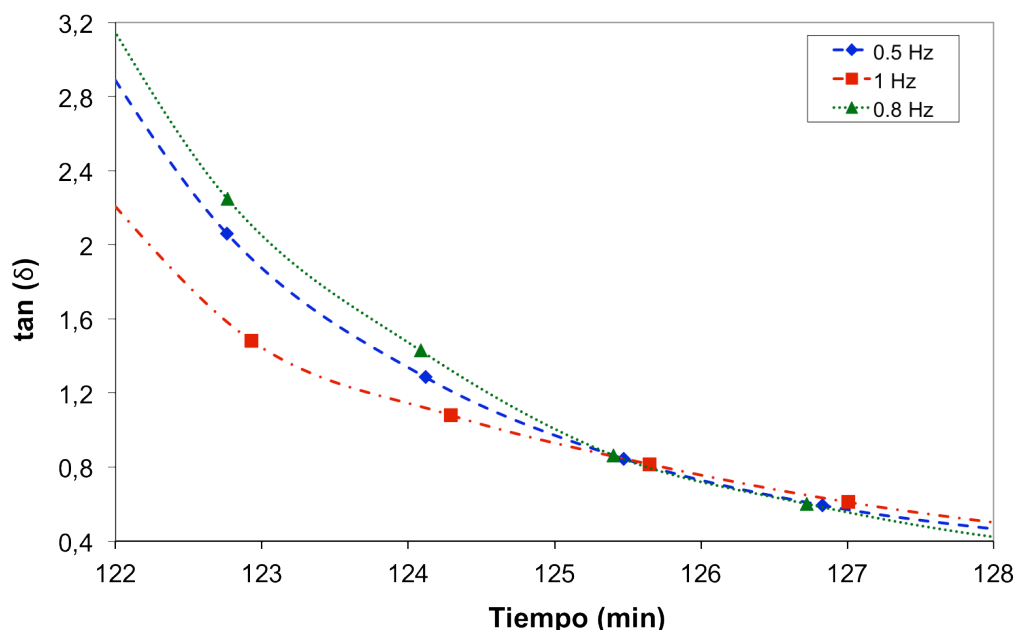


Figura 4.17. Representación de $\tan(\delta)$ en función del tiempo para diferentes frecuencias (0.5, 0.8 y 1 Hz) para la muestra QX. El tiempo de gelificación se determina en el punto de intersección de las curvas $\tan(\delta)$.

4.5. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS

La preparación de *scaffolds* 3D porosos de quitosano en presencia de fosfato de calcio y CFX se lleva a cabo mediante proceso criogénico ISISA ([ver apartado 3.2.1.4](#)).

En primer lugar se preparan las distintas disoluciones de quitosano con distintas concentraciones de ureasa adicionales (125, 175 y 175 μL). Las disoluciones se introducen en jeringuillas de insulina antes de que se produzca su gelificación; entonces, se someten al tratamiento térmico (24 horas, 37 °C). A continuación, estas jeringuillas se congelan por inmersión a velocidad constante (2,7 mm/min) en un baño de nitrógeno líquido (-196 °C), y se liofilizan. Del liofilizado de estas muestras se obtienen monolitos con formas y tamaño de las jeringuillas utilizadas como molde en el proceso de congelado. Una vez descartadas las partes densa y celular de los *scaffolds* ([ver apartado 3.2.1.5](#)), se procede a su caracterización.

4.5.1. MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LAS MATRICES

La liofilización de las muestras preparadas da lugar a monolitos con la forma y tamaño de las jeringuillas utilizadas como molde en el proceso de congelado. La estructura interna de estos monolitos muestra una macroporosidad homogénea a lo largo de todo su superficie tal y como se observa en las imágenes de microscopía SEM (Fig. 4.18).

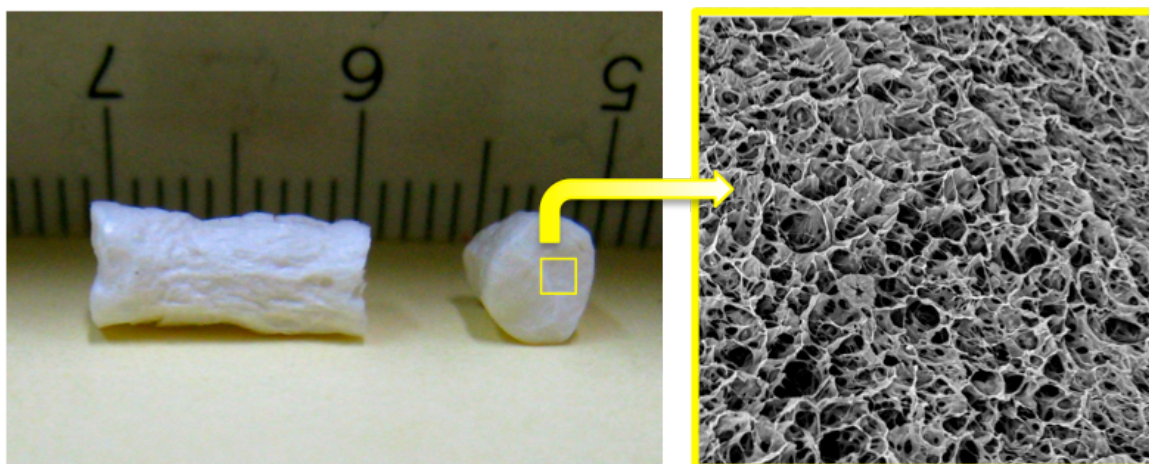


Figura 4.18. Izquierda: Fotos de monolitos de quitosano. Derecha: Micrografía de SEM del *scaffold* a distintas magnificaciones.

De acuerdo con las micrografías de SEM de los *scaffolds* preparados con quitosano (sin aditivos) a distintas concentraciones de ureasa (32, 38.5, 45 U/mL, respectivamente por las matrices Q125, Q150 y Q175) no se observan diferencias significativas en la morfología (Fig. 4.19).

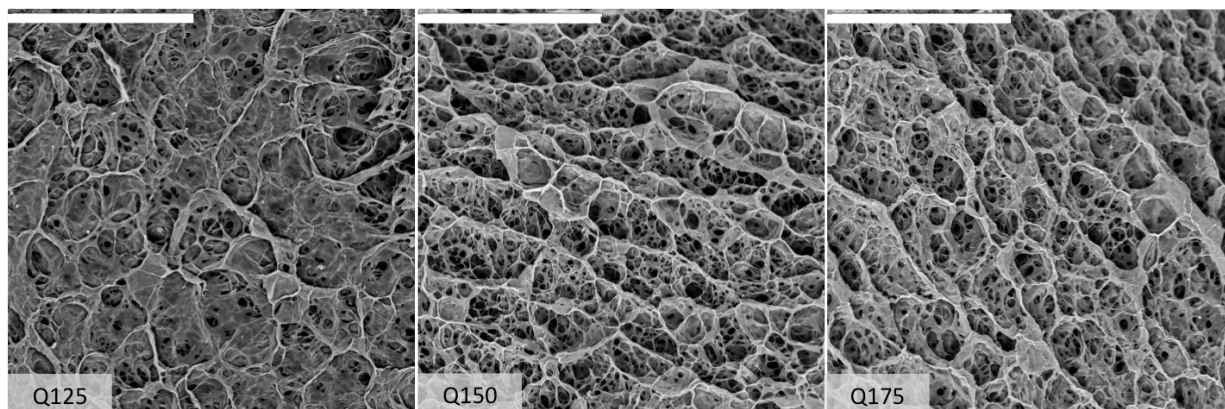


Figura 4.19. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de quitosano preparados con distintas concentraciones de ureasa a 37 °C: respectivamente, Q125, Q150 y Q175 (barra de escala 200 μ m).

Observando los *scaffolds* de quitosano con CFX, obtenidos añadiendo distintas concentraciones de ureasa (QX125, QX150 y QX175), se evidencia que el tamaño de los cristales de CFX inmovilizados dentro de las estructuras macroporosas de quitosano aumenta al disminuir de la concentración de enzima (Fig. 4.20). Esta característica puede atribuirse al mayor tiempo de gelificación y por tanto de formación de cristales en matrices donde la escasa concentración de enzima provoca subidas lentas de pH. En particular, las micrografías SEM de las estructuras macroporosas de quitosano QX175 no evidencian la formación de cristales de CFX. De nuevo, el fenómeno, se atribuye al menor tiempo de gelificación que determina un rápido aumento de la viscosidad en el proceso de formación del hidrogel, impidiendo la difusión de la materia y desfavoreciendo la formación de los cristales de CFX.

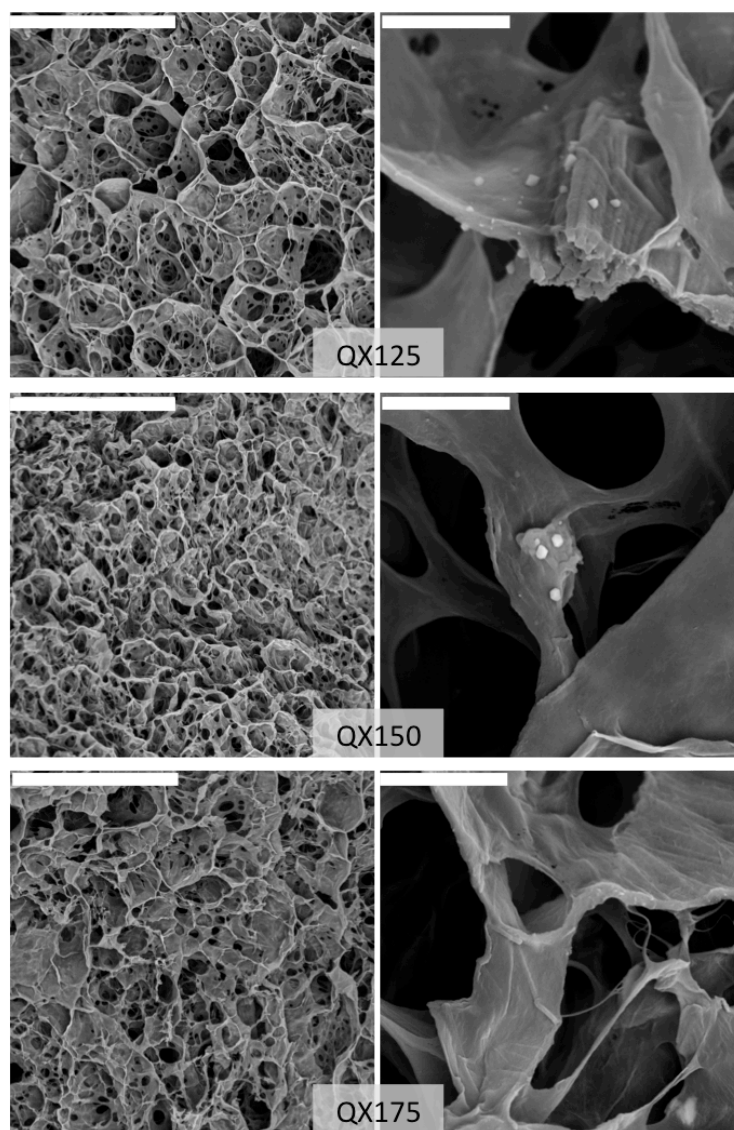


Figura 4.20. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds*, respectivamente, QX125, QX150 y QX175 (barra de escala: izquierda 200 μm, derecha 10 μm).

Como se ha mencionado anteriormente para los *scaffolds* de quitosano y fosfato de calcio (QP), la presencia de esta sal inorgánica casi duplica el tiempo de gelificación (ver apartado 4.4). Las micrografías SEM de estas estructuras macroporosas muestran la formación de cristales micrométricos dispuestos en forma de flores (Fig. 4.21) y dispersos en el *scaffold*, de modo similar a las imágenes descritas anteriormente para la formación de HAp en disolución (ver apartado 4.3.1). Este fenómeno, debe atribuirse de nuevo a un tiempo de gelificación más lento que favorece la formación de los cristales de HAp para todas las concentraciones de ureasa estudiadas. La formación de estos cristales se confirma mediante espectroscopia de sólidos ^1H RMN. El espectro del precipitado presenta la banda centrada a 0 ppm, característica de los grupos hidroxilo de HAp (Fig. 4.22).

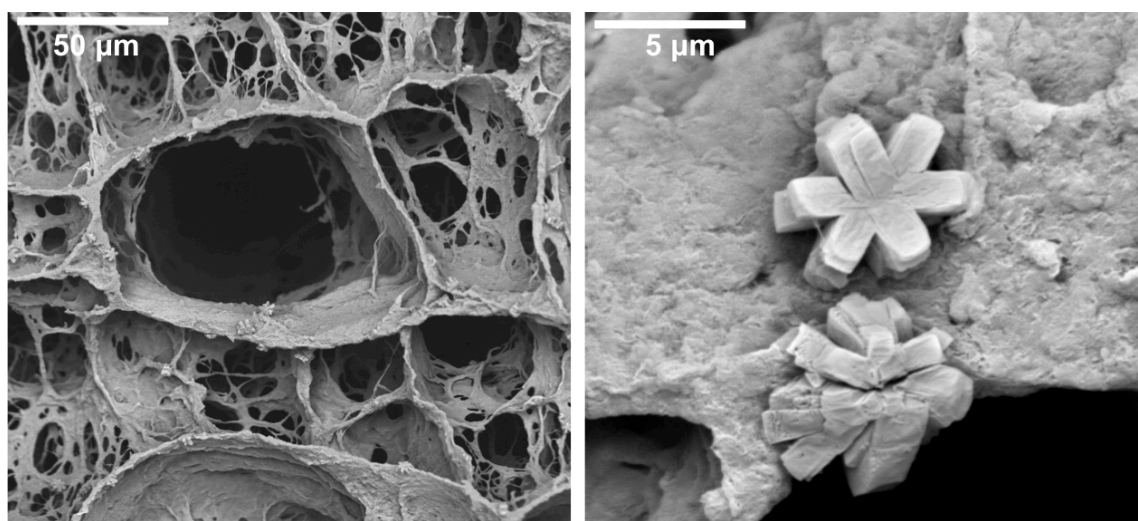


Figura 4.21. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* QP150.

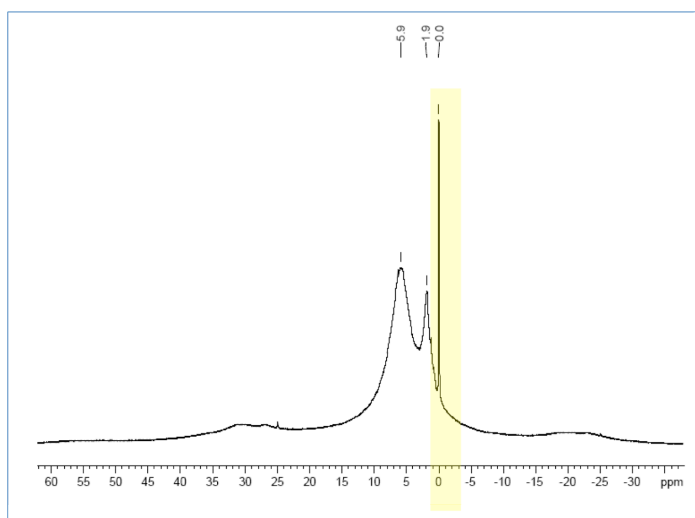


Figura 4.22. Espectro ^1H RMN de la muestra QP175.

El fenómeno de la formación de cristales de distintos tamaño condicionado por los diversos tiempos de gelificación, también se observa en las estructuras macroporosas de quitosano con fosfato de calcio y CFX, obtenidas empleando distintas cantidades de ureasa. Las micrografías de SEM de las estructuras preparadas con mayor cantidad de ureasa (QPX175) revelan la formación de cristales cuya morfología, de forma de aguja, se asemeja a la de los cristales de CFX más que de los cristales de HAp (Fig. 4.23). En este caso, el tiempo de gelificación es suficiente para permitir la precipitación de CFX, pero no para la precipitación de la HAp. Además, como se ha mencionado (ver apartado 4.3.2) la presencia de los cristales de CFX favorece la formación de ACP frente a HAp.

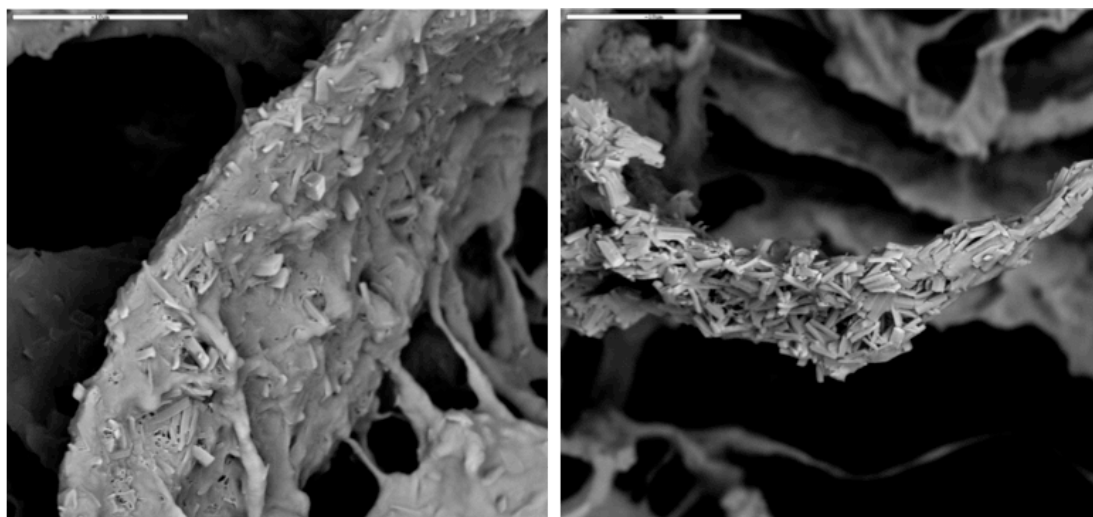


Figura 4.23. Micrografías SEM de *scaffolds* QXP175. Barras de escala de 10 μm .

Lamentablemente, no es posible observar por SEM las nanopartículas de ACP, así que las muestras se estudian por espectroscopía de ^1H RMN que se confirma la formación de ACP en lugar de HAp. No obstante, se observa un pico estrecho a 0 ppm, aunque su baja intensidad permite descartar una presencia relevante de HAp (Fig. 4.24). En realidad, este pico de baja intensidad se observa también en los espectros ^1H RMN de los *scaffolds* de quitosano que contienen CFX (es decir, en ausencia de sales de fosfato de calcio). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el pico ancho centrado en 5 ppm, típico del agua absorbida y estructural, es característico de ACP. La presencia de ACP es confirmada además, por la presencia del pico ancho centrado en 2.6 ppm en el espectro de ^{31}P RMN y ^{31}P CP MAS RMN (Fig. 4.25) de acuerdo con la tendencia anterior mostrada en la figura 4.11.⁵³

La formación de ACP en *scaffolds* de quitosano con CFX, también se confirma mediante análisis de TEM. Las micrografías de las muestras tratadas mediante ionización por plasma

(tratamiento efectuado para eliminar el polímero de la matriz, ver apartado 3.2.1.5.2) evidencian la formación de cristales de forma granular y de tamaño nanométrico típicos de ACP (Fig. 4.26). Además, la imposibilidad de sacar imágenes de difracción para esta muestra es otra confirma del carácter amorfo de las partículas de fosfato de calcio precipitadas en estas matrices.

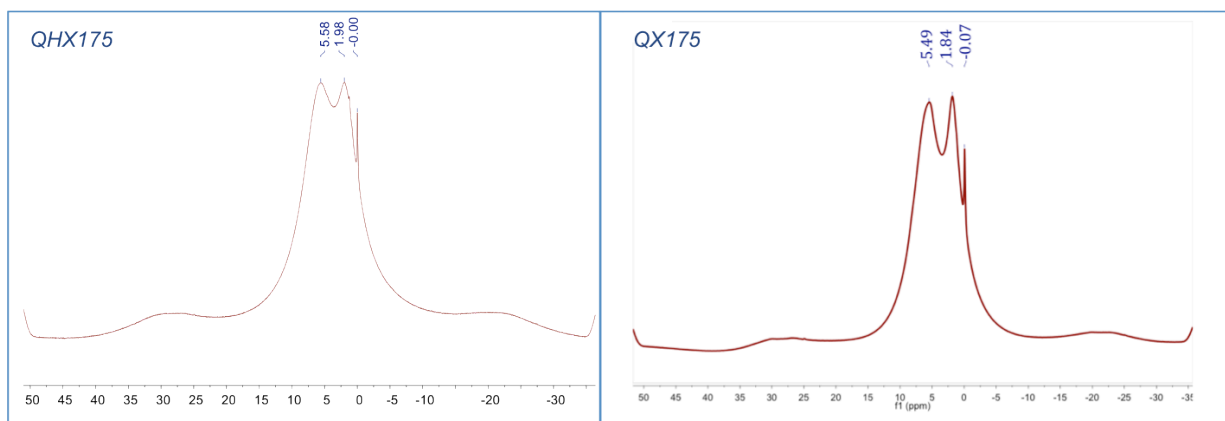


Figura 4.24. Espectros ^1H RMN de los *scaffolds*: QPX175 (izquierda) y QX175 (derecha).

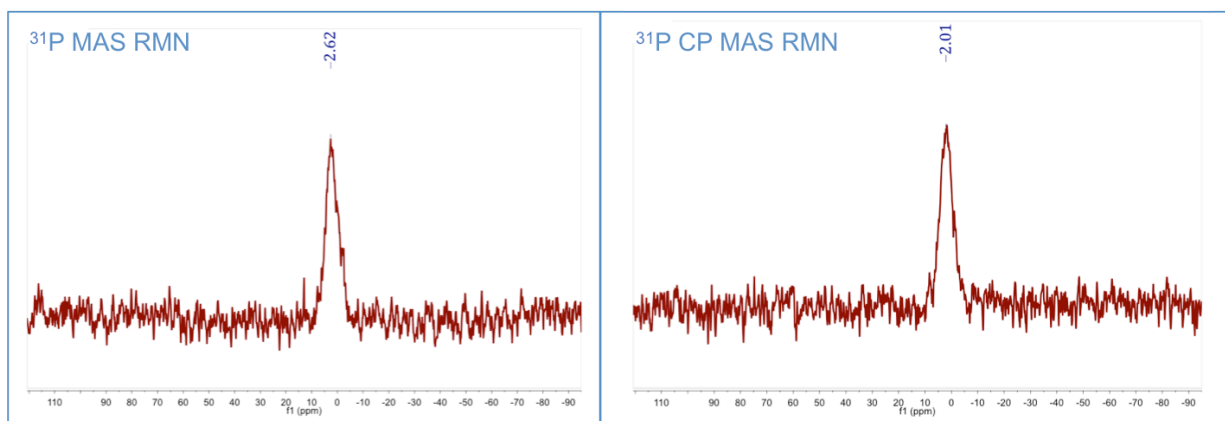


Figura 4.25. Espectros ^{31}P MAS RMN (izquierda) y ^{31}P CP MAS RMN (derecha) de *scaffold* QPX175.

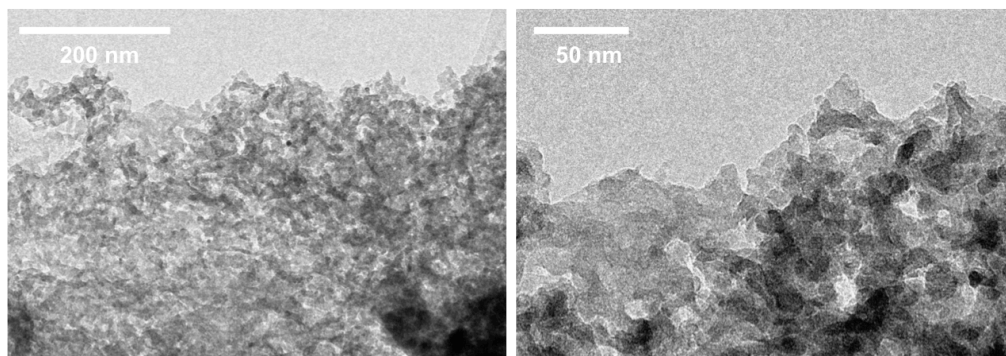


Figura 4.26. Micrografías TEM de ACP en la matriz QPX175.

4.5.2. PROPIEDADES MECANICAS

El estudio de las propiedades mecánicas se refiere a la respuesta de un cuerpo cuando se le somete a una fuerza externa, la cual genera relaciones del tipo tensorial con la deformación que sufre este material (en general válidas para la zona elástica). De los diferentes ensayos existentes, el ensayo de tracción en una dimensión proporciona la mayoría de los datos relevantes para un primer estudio mecánico de materiales. En una prueba convencional de tensión, la muestra se fractura casi instantáneamente en un plano aproximadamente perpendicular al plano donde actúa la fuerza de tensión. Este ensayo consiste en someter el material a una velocidad de deformación constante, y medir la fuerza necesaria para cada deformación, esto se realiza generalmente hasta que el material se fractura. La fuerza máxima es la resistencia a la tensión del material. Finalmente, se obtiene una curva donde en el eje de las abscisas se muestra la deformación del material y en el eje de las ordenadas la tensión requerida. Se determinan los valores de resistencia a tensión de diferentes *scaffolds* de quitosano a partir del análisis de las curvas de tensión-deformación obtenidas para cada *scaffold* preparado con la mayor concentración de ureasa (Q175, QP175, QX175, QPX175). En la [figura 4.27](#) se representa la evolución de la resistencia a la tensión.

Los *scaffolds* analizados presentan un comportamiento mecánico gobernado por la ley de Hooke, es decir, presentan una zona de deformación elástica, seguida por una zona de alargamiento de la muestra en donde la carga se mantiene constante, esta es la zona de deformación irreversible o plástica, tras la cual sigue la ruptura de la matriz de quitosano.⁵⁴ Las diferencias en la composición de los distintos *scaffolds* preparados debían verse reflejadas en sus propiedades mecánicas. Como mencionado anteriormente la hidroxiapatita es uno de los componentes esenciales en el tejido duro en el organismo y su función es exactamente la de aumentar la resistencia mecánica de los tejidos. Efectivamente, este comportamiento se refleja en las matrices de quitosano preparadas, donde la mayor resistencia a la tensión se da en presencia de HAp mientras que la resistencia más baja se observa en los *scaffolds* de quitosano puro. Todas las matrices con CFX muestran un valor intermedio de la deformación de ruptura. En este caso la presencia del antibiotico favorece la formación de ACP con respecto a los cristales grandes de HAp ([ver apartado 4.5.1](#)) disminuyendo la resistencia a la fractura del soporte con respecto a las matrices con HAp, pero, al mismo tiempo, la presencia de los cristales de CFX determina un aumento de la resistencia con respecto a las matrices de quitosano puro ([Tabla 4.3](#)).

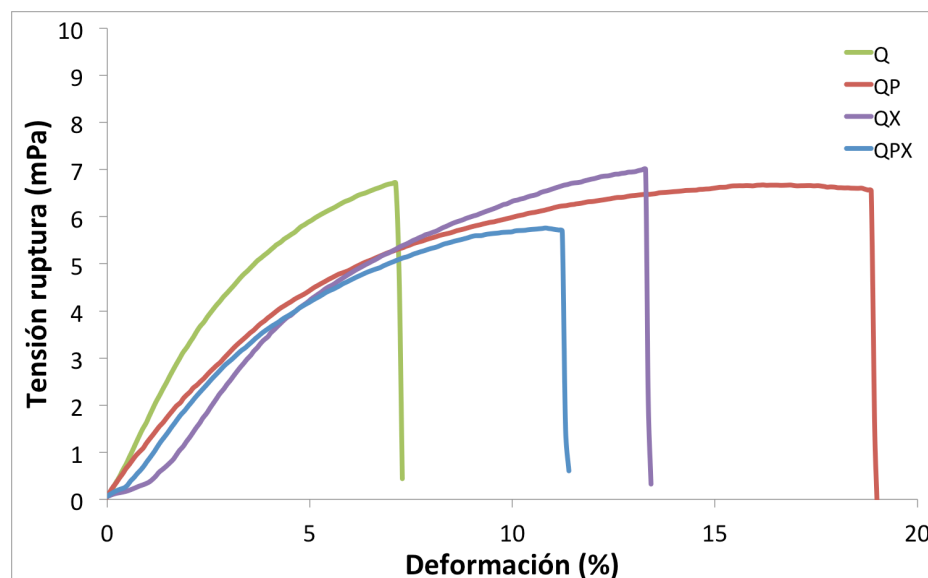


Figura 4.27. Resistencia a tensión de diferentes *scaffolds* de quitosano: Q175 (verde); QP175 (rojo); QX175 (violeta); QPX175 (azul).

Tabla 4.3. Datos de la propiedades mecánicas de distintas matrices de quitosano (Q175; QP175; QX175; QPX175).

Muestra	Módulo (GPa)	Tensión máxima (MPa)	Carga máxima (N)	Deformación ruptura (%)
<i>Scaffold Q</i>	0.12±0.02	4.92±0.10	7.37±1.00	9.97±1.00
<i>Scaffold QX</i>	0.15±0.03	7.45±0.40	11.15±1.50	13.56±1.00
<i>Scaffold QP</i>	0.12±0.01	5.50±0.80	8.22±1.80	17.95±0.80
<i>Scaffold QPX</i>	0.13±0.01	5.77±0.12	8.64±0.80	11.87±0.90

4.5.3. PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO

El hinchamiento, habilidad de un material a retener agua, es una propiedad importante para la absorción de fluidos del cuerpo, para la transferencia de nutrientes celulares y metabolitos a través del material, y para controlar la liberación de un fármaco atrapado en el interior de un *scaffold*.^{55,56} En los hidrogeles existe un entramado de origen físico, puesto que las cadenas se enredan unas con otras en una maraña (red) tridimensional que puede albergar y retener moléculas de líquido. Durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red asumen una configuración elongada, esta dilatación viene acompañada de la aparición de una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, que actúa como una presión ejercida por las cadenas de la malla sobre el disolvente contenido en ella. A medida que la malla se hincha con el disolvente aumenta dicha presión elástica y el hinchamiento alcanza su valor máximo o de

equilibrio cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas. Las matrices de quitosano usadas en este trabajo, presentan una alta capacidad hidrofílica debida a los grupos $-OH$ y a los $-NH_2$. Los hidrogeles de quitosano presentan un alto contenido en agua, parte de la cual se encuentra fuertemente ligada al polímero, y el resto está presente como agua libre. La habilidad de estos hidrogeles para hincharse y deshidratarse depende de su composición, pero también de factores ambientales, como el disolvente y las condiciones del experimento. En este trabajo se ha estudiado el hinchamiento en tampón fosfato (PBS 0.1M) a 37 °C con el fin de simular las condiciones fisiológicas. No se han encontrado diferencias notables entre las distintas muestras de quitosano estudiadas (Q175, QP175, QX175, QPX175) (Fig. 4.28). La entrada de líquido en el interior del *scaffold* alcanza un límite o grado máximo de hinchamiento, entre el 90-95%. Se puede observar, sin embargo, una sutil diferencia en la matriz QP175, debida a la mayor rigidez de la estructura por la presencia de HAp, que limita la libertad configuracional de las cadenas que alcanzan un menor grado de hinchamiento. Los *scaffolds* preparados en esta memoria absorben fluido aproximadamente 80 veces su peso inicial por lo que resultan adecuados en su uso como biomaterial en Ingeniería de tejidos.⁵⁷

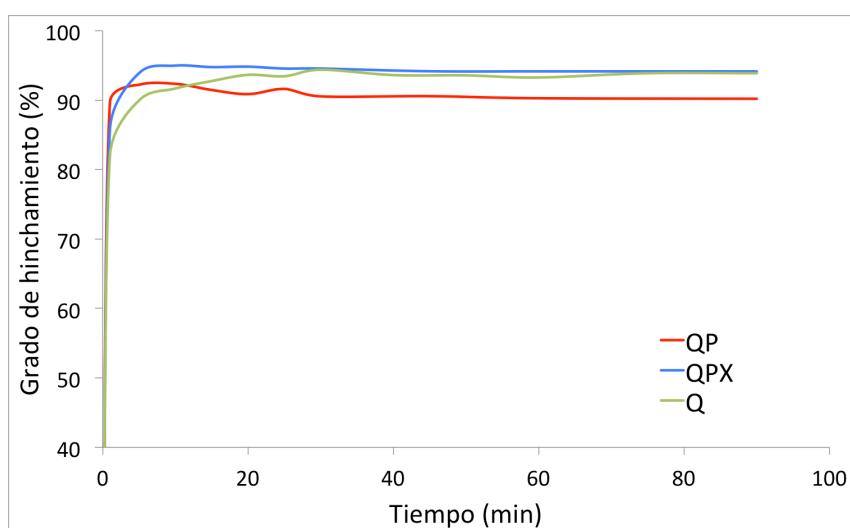


Figura 4.28. Gráfico de los valores de hinchamiento de diferentes matrices de quitosano en función del tiempo para concentraciones iniciales de ureasa de 175 mM.

4.5.4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE CFX

En este trabajo se ha estudiado las cinéticas de liberación de los cristales de CFX de los *scaffolds* QHX y QX preparados con distintas cantidades de ureasa, con una concentración de CFX en la disolución original de 40 mg/mL. Se pretende analizar cómo la diferente morfología

de los sistemas obtenidos influye en la velocidad de liberación del antibiótico. Los estudios de liberación se llevan a cabo en un tampón fosfato (PBS) 0.1M a pH=7.4 a 37 °C, intentando simular condiciones fisiológicas. Tal y como se observa en la [figura 4.29](#), en el perfil de liberación de un scaffold tipo de quitosano con CFX y ACP (QPX150) es posibles distinguir dos zonas que presentan cinéticas diferentes a lo largo de la liberación. La primera zona correspondería al efecto Burst (durante los primeros 15 min). Después se observa otra zona con un perfil de liberación más sostenido, que correspondería a la liberación de los cristales totalmente embebidos en la macroestructura.

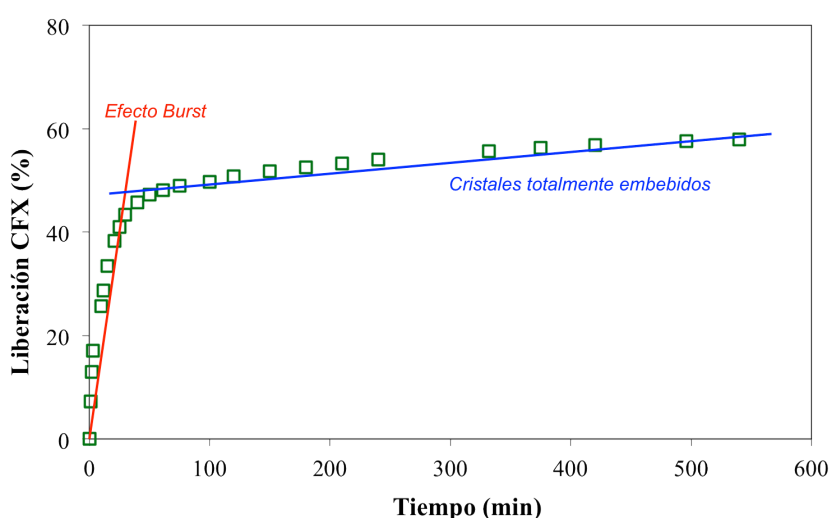


Figura 4.29. Perfil general de liberación de CFX en tampón fosfato a pH=7.4 de *scaffolds* QPX150. En rojo y azul se presentan los diferentes ajustes cinéticos para las distintas cinéticas observadas a lo largo de la liberación.

El origen de estas dos cinéticas está relacionado con la existencia de dos formas polimorfas de los cristales de CFX. Como se ha mencionado anteriormente, los cristales de CFX anhidros son fácilmente solubles e hidrolizables. El proceso de liofilización utilizado para la preparación de *scaffolds* da lugar a la obtención de cristales de CFX anhidros. Cuando un cristal anhidro se pone en contacto con una disolución acuosa, la parte más externa del cristal se puede disolver instantáneamente, sin embargo, el núcleo interno se hidrata antes de poder disolverse, haciendo que éste no pueda ser solubilizado a la misma velocidad observada para la parte más externa del cristal. Es decir, tienen lugar diferentes cinéticas de disolución y, por tanto, de liberación. En la [figura 4.30](#) se explica de manera esquemática la hidratación de un cristal anhidro de CFX, pasando por un estado intermedio y llegando hasta la hidratación total. Así cuanto menor es el tamaño del cristal mayor será la relación superficie externa/volumen y, por tanto, se habrá un mayor porcentaje de CFX liberado durante el efecto Burst. Las cinéticas de liberación de CFX

de las diferentes muestras, preparadas con distintas cantidad de ureasa, ponen de manifiesto que a medida que el tamaño de los cristales anhídrido de CFX disminuye, la superficie externa al núcleo interno del cristal aumenta y por lo tanto el porcentaje de CFX liberado es de tipo Burst.

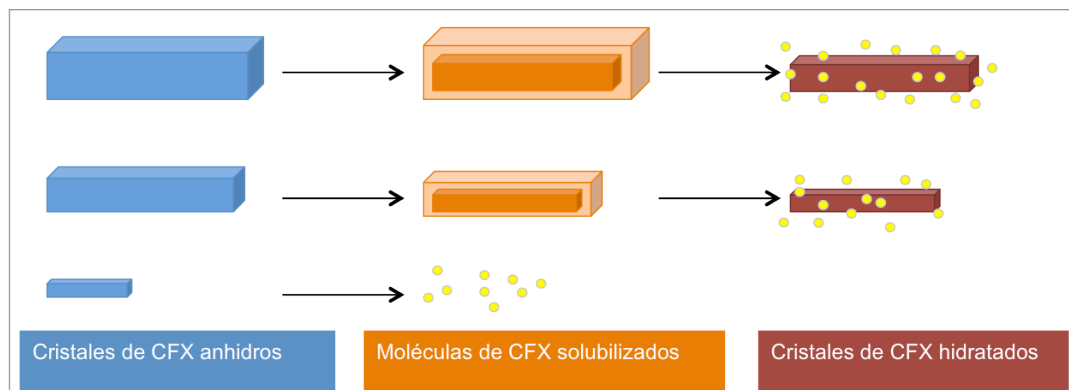


Figura 4.30. Fenómeno de disolución de los cristales de CFX.

Comparando los perfiles de liberación de CFX de las matrices de quitosano con fosfato de calcio, se observa cómo los scaffolds preparados con mayor cantidad de ureasa (QPX175), y por tanto los que siguen un tiempo de gelificación más corto, favoreciendo la precipitación de cristales de HAp menores, presentan un mayor porcentaje de liberación tipo Burst. Por el contrario, la menor cantidad de ureasa en la mezcla inicial, ralentiza la formación de los hidrogeles permitiendo mayores crecimientos de los cristales de CFX, y por tanto menores porcentajes de liberación totales por efecto Burst de antibiótico (Fig. 4.31).

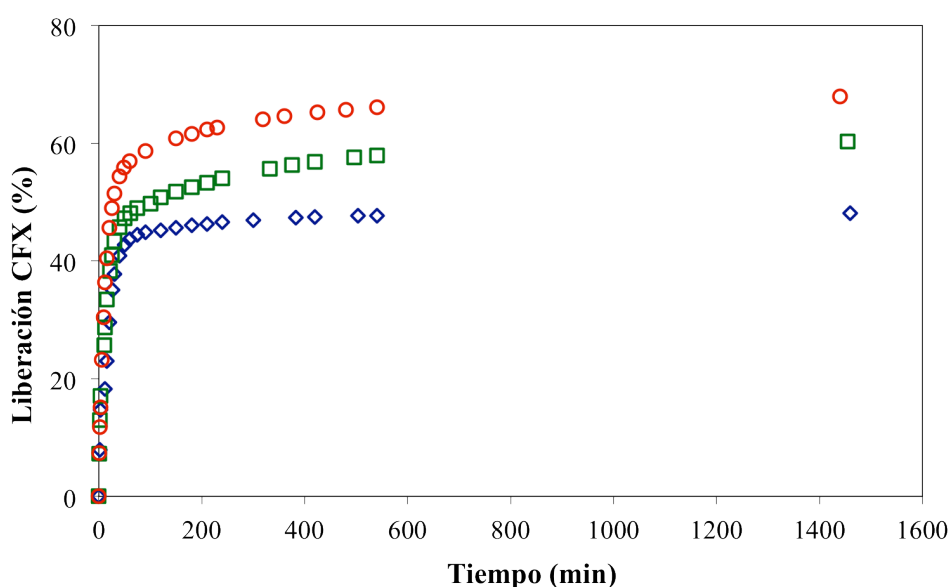


Figura 4.31. Perfil de liberación en tampón fosfato 0.1 M a pH=7.4 de los scaffolds: QPX125 (rombo azul); QPX150 (cuadrado verde); QPX175 (círculo rojo).

Por otra parte, para todas las concentraciones de ureasa se obtuvieron perfiles de liberación de CFX más lentos que los correspondientes con fosfato de calcio (Fig. 4.32). En la figura 4.33 se muestran las micrografías de SEM de los scaffolds QX175 (Fig. 4.33-A/B) y QPX175 (Fig. 4.33-C/D). Como se puede observar, en las matrices sin fosfato de calcio, los cristales de CFX se encuentran completamente embebidos en el scaffold de quitosano, mientras que en los scaffolds preparados en presencia de fosfato de calcio los cristales de CFX están distribuidos por la superficie facilitando la liberación.

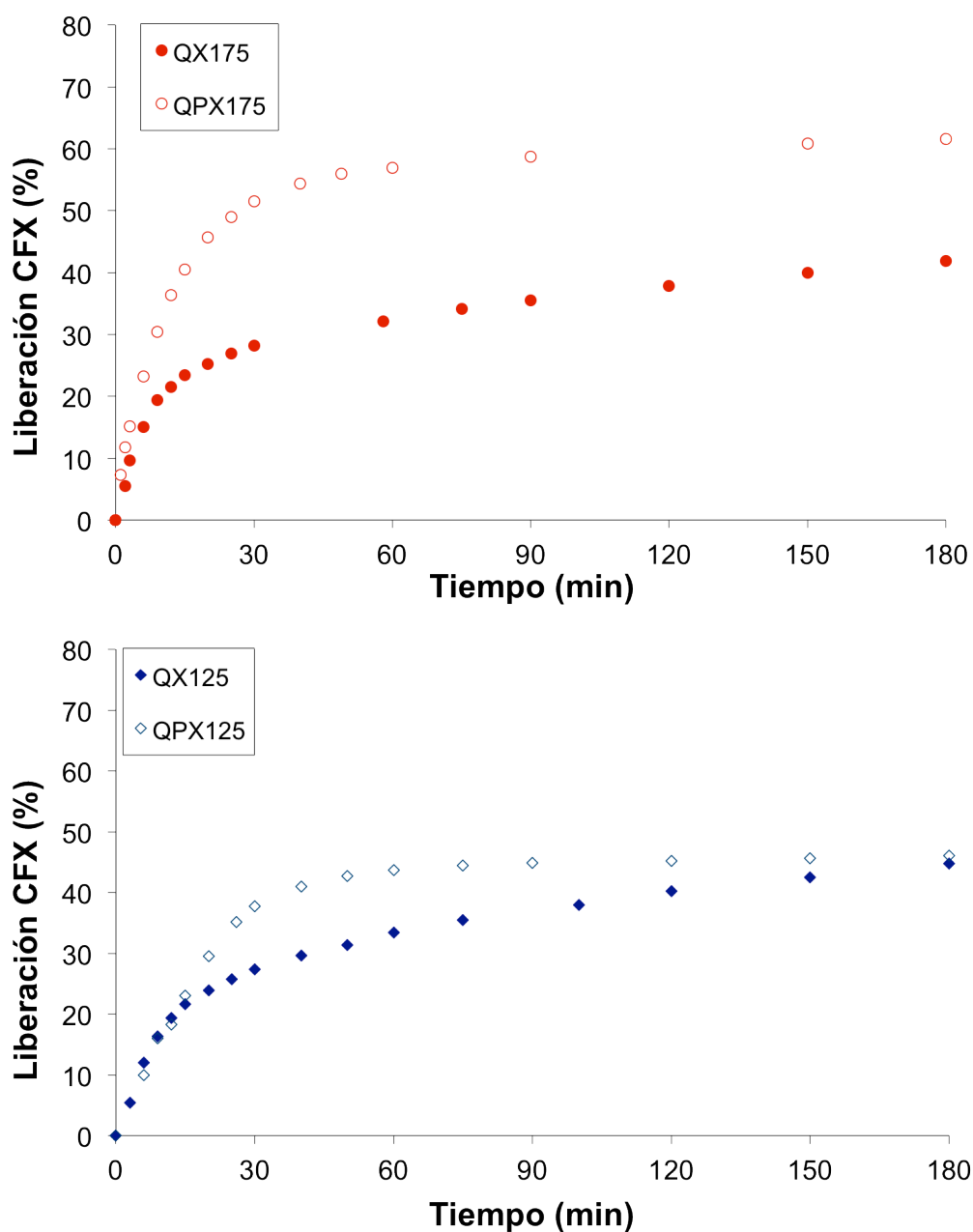


Figura 4.32. Perfil del liberación en tampón fosfato 0.1 M a pH=7.4 de los *scaffolds*: QX175 y QPX175 (arriba); QX125 y QPX125 (abajo).

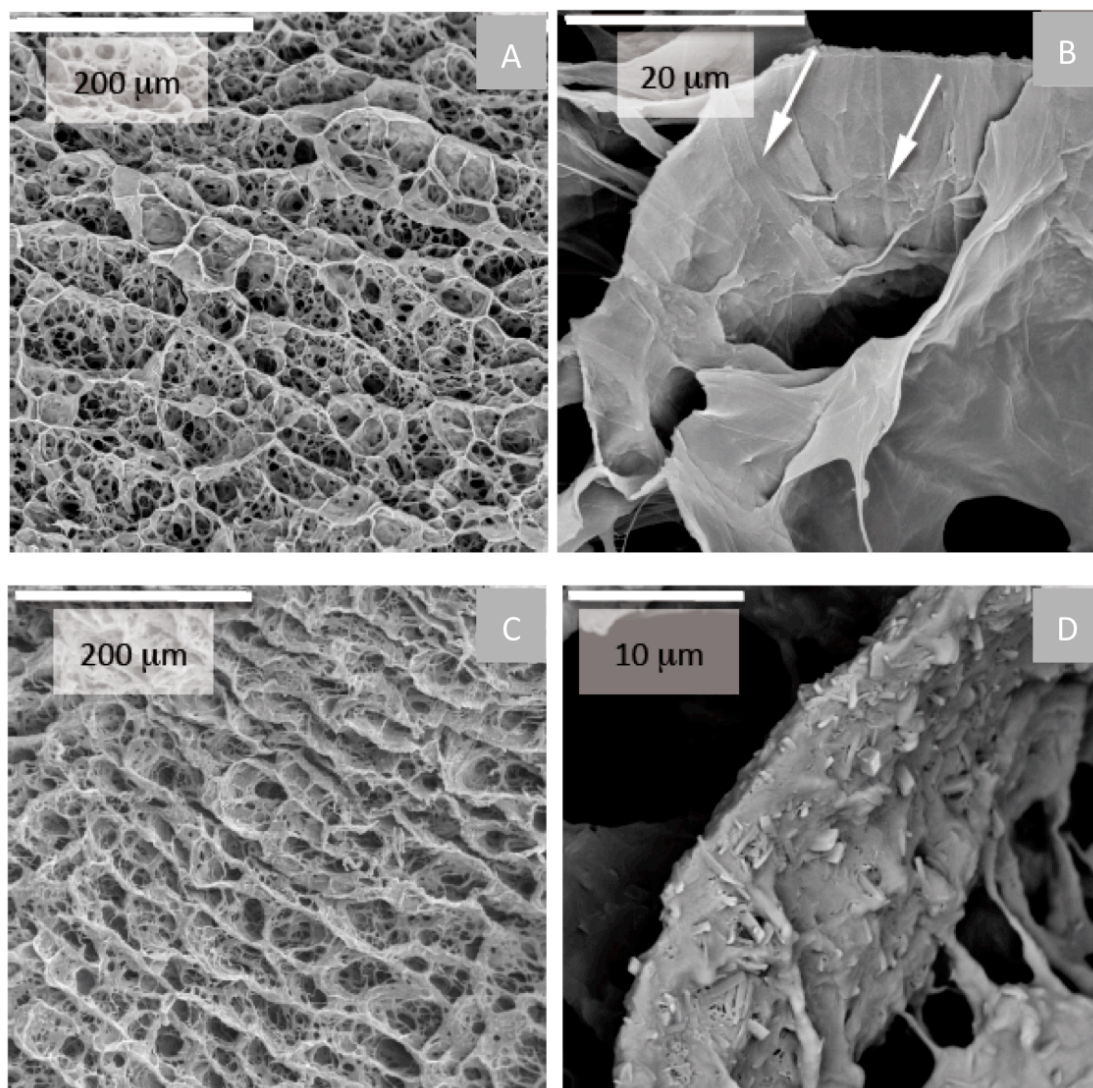


Figura 4.33. Micrografías de SEM de *scaffolds* QXP175. Barras de escala de 10 μm.

4.6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La inmovilización de más una sustancia en una estructura polimérica biocompatible permite la formación de un biomaterial multifuncional. En este apartado se ha descrito la inmovilización de fosfato de calcio amorfo, como componente que puede favorecer la regeneración de tejido óseo, y de ciprofloxacino, como antibiótico que puede evitar infecciones resultantes de la implantación quirúrgica del material. El trabajo se ha centrado en el estudio de la co-precipitación de los distintos componentes dispersos en la matriz polimérica. Mediante distintas técnicas de caracterización (SEM, TEM y DRX), se observa la co-precipitación de fosfato de calcio amorfo y ciprofloxacino se produce de modo separado. Así, la morfología de los cristales de ciprofloxacino resulta idéntica (en forma de aguja) de la obtenida en ausencia de sales de fosfato de calcio. También el tamaño y la morfología del fosfato de calcio amorfo resulta parecida cuando la precipitación se la lleva a cabo con o sin CFX. Sin embargo, la fase amorfa, que se deposita sobre los cristales de CFX, resulta más estable en presencia del antibiótico. Los *scaffolds* de quitosano obtenidos tras la incorporación de fosfato de calcio amorfo y CFX resultan potencialmente adecuados para la regeneración de tejido y la liberación controlada de fármaco. En particular, se ha demostrado la capacidad de emplear estos soportes como sistemas de liberación controlada.

4.7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ R. Duncan, "Polymer therapeutics as nanomedicines: New perspectives" *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2011) 492-501.
- ² J.B. Wolinsky, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, "Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers" *Journal of Controlled Release* 159 (2012) 14-26.
- ³ B.J. Crielaard, T. Lammers, R.M. Schiffelers, G. Storm, "Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one" *Journal of Controlled Release* (2012) Article in press
- ⁴ P. Colombo, "Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route", *Advanced Drug Delivery Reviews* 11 (1993) 37-57.
- ⁵ P. Colombo, R. Pettini, P. Santi, N.A. Peppas, "Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance" *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3 (2000) 198-204.
- ⁶ A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, "Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ" *Biomaterials* 21 (2000) 2155-2161.
- ⁷ L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R.J. Biron, D.B. Eagles, D.C. Lesnoy, S.K. Barlow, R. Langer, "Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering" *Nature Biotechnology* 12 (1994) 689-693.
- ⁸ H.E. Davis, J.K. Leach, "Designing bioactive delivery systems for tissue regeneration" *Annals of Biomedical Engineering* 39 (2011) 1-13.
- ⁹ L.G. Griffith, G. Naughton, "Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities" *Science* 295 (2002) 1009.
- ¹⁰ L. Wei, J. Lin, C. Cai, Z. Fang, W. Fu, "Drug-carrier/hydrogel scaffold for controlled growth of cells" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78 (2011) 346-354.
- ¹¹ S. Huang, X. Fu, "Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration" *Journal of Controlled Release* 142 (2010) 149-159.
- ¹² H. Cölfen, S. Mann, "Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures" *Angewandte Chemie - International Edition* 42 (2003) 2350-2365.
- ¹³ J.F. Banfield, S. A. Welch, H. Zhang, T. Thomsen Ebert, R. Lee Penn, "Aggregation-based crystal growth and microstructure development in natural iron oxyhydroxide biomineralization products" *Science* 289 (2000) 751-754.
- ¹⁴ R. Lee Penn, J.F. Banfield, "Imperfect oriented attachment: dislocation generation in defect-free nanocrystals" *Science* 281 (1998) 969-971.
- ¹⁵ C. Sanchez, H. Arribart, M.M. Giraud Guille, "Biomimeticism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems" *Nature Materials* 4 (2005) 277-288.
- ¹⁶ B. Bensaude-Vincent, H. Arribart, Y. Bouligand, C. Sanchez, "Chemists and the school of nature" *New Journal of Chemistry* 26 (2002) 1-5.
- ¹⁷ G. He, T. Dahl, A. Veis, A. George, "Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1" *Nature Materials* 2 (2003) 552-558.
- ¹⁸ K.J.C. van Bommel, A. Friggeri, S. Shinkai, "Organic templates for the generation of inorganic materials" *Angewandte Chemie - International Edition* 42 (2003) 980-999.
- ¹⁹ B.J. Tarasevich, C.J. Howard, J.L. Larson, M.L. Snead, J.P. Simmer, M. Paine, W.J. Shaw, "The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin" *Journal of Crystal Growth* 304 (2007) 407-415.

- ²⁰ J. Tao, H. Pan, Y. Zeng, X. Xu, R. Tang, "Roles of amorphous calcium phosphate and biological additives in the assembly of hydroxyapatite nanoparticles" *The Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007) 13410-13418.
- ²¹ A. Ahmad, P. Mukherjee, D. Mandal, S. Senapathi, M.I. Khan, R. Kumar, M. Sastry, "Enzym mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*" *Journal of American Chemical Society* 124 (2002) 12108-12109.
- ²² S.S. Shankar, A. Rai, B. Ankamwar, A. Singh, A. Ahmad, M. Sastry, "Biological synthesis of triangular gold nanoprisms" *Nature Materials* 3 (2004) 482-488.
- ²³ M.A. Meyers, P.-Y. Chen, A.Y.-M. Lin, Y. Seki, "Biological materials: Structure and mechanical properties" *Progress in Materials Science* 53 (2008) 1-206.
- ²⁴ F. Barthelat, "Biomimetics for next generation materials" *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 365 (2007) 2907-2919.
- ²⁵ G. Bajaj, Y. Yeo "Drug delivery systems for intraperitoneal therapy" *Pharmaceutical Research* 27 (2010) 735-738.
- ²⁶ R.K. Shukla, A. Tiwari, "Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon" *Carbohydrate Polymers* 88 (2012) 399-416.
- ²⁷ K.Y. Lee, S.H. Yuk, "Polymeric protein delivery systems" *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 669-697.
- ²⁸ C. Elvira, A. Gallardo, J. Roman, A. Cifuentes, "Covalent polymer-drug conjugates" *Molecules* 10 (2005) 114-125.
- ²⁹ A. Gallardo, B. Vázquez, C. Elvira, J. San Román, "Sistemas de liberación controlada de medicamentos en Biomateriales", 1ª Edición, *Faenza Editrice Ibérica, S.L. CYTED* (2004) 449-471.
- ³⁰ J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 19-34.
- ³¹ A.S. Aly, "Self-dissolving chitosan. I. Preparation, characterization and evaluation for drug delivery system" *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 259 (1998) 13-18.
- ³² J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, "Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 35-52.
- ³³ N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, "Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology" *Advanced Materials* 18 (2006) 1345-1360.
- ³⁴ M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, "Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications" *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- ³⁵ A. Borzacchiello, L. Ambrosio, P.A. Netti, L. Nicolais, C. Peniche, A. Gallardo, J. San Roman, "Chitosan-based hydrogels: Synthesis and characterization" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 (2001) 861-864.
- ³⁶ Q. Hu, Z. Tan, Y. Liu, J. Tao, Y. Cai, M. Zang, H. Pan, X. Xu, R. Tang, "Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells" *Journal of Materials Chemistry* 17 (2007) 4690-4698.
- ³⁷ J. Song, E. Saiz, C.R. Bertozzi, "A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: an efficient process toward 3-dimensional bonelike composites" *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 1236-1243.
- ³⁸ A. Chenite, S. Gori, M. Shive, E. Desrosiers, M.D. Buschmann, "Monolithic gelation of chitosan solutions via enzymatic hydrolysis of urea" *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 419-424.

- ³⁹ I. Aranaz, M.C. Gutiérrez, L. Yuste, F. Rojo, M.L. Ferrer, F. Del Monte, "Controlled formation of the anhydrous polymorph of ciprofloxacin crystals embedded within chitosan scaffolds: Study of the kinetic release dependence on crystal size" *Journal of Materials Chemistry* 19 (2009) 1576-1582.
- ⁴⁰ M.C. Gutiérrez, M. Jobbágy, M.L. Ferrer, F. Del Monte, "Enzymatic synthesis of amorphous calcium phosphate-chitosan nanocomposites and their processing into hierarchical structures" *Chemistry of Materials* 20 (2008) 634-648.
- ⁴¹ L. Yu, "Amorphous pharmaceuticals - Preparation, characterization and stabilization" *Advanced Drug Delivery Reviews* 48 (2001) 27-42.
- ⁴² X. Li, F. Zhi, Y. Hu, "Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin" *International Journal Pharmaceutics* 328 (2007) 177-182.
- ⁴³ X. Yu, G.L. Zipp, G.W.R. Davidson III, "The effect of temperature and pH on the solubility of quinolone compounds: Estimation of heat of fusion" *Pharmaceutical Research* 11 (1994) 522-527.
- ⁴⁴ S.V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates" *Journal of Materials Science* 42 (2007) 1061-1095.
- ⁴⁵ M. Šupová, "Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 1201-1213.
- ⁴⁶ W.H.R. Shaw, J.J. Bordeaux, "The decomposition of urea in aqueous media" *Journal of American Chemical Society* 77 (1955) 4729-4733.
- ⁴⁷ A. Vyalikh, P. Simon, T. Kollmann, R. Kniep, U. Scheler, "Local environment in biomimetic hydroxyapatite-gelatin nanocomposites as probed by NMR spectroscopy" *Journal of Physical Chemistry C* 115 (2011) 1513-1519.
- ⁴⁸ J. Tropp, N.C. Blumenthal, J.S. Waugh, "Phosphorus NMR study of solid amorphous calcium phosphate" *Journal of the American Chemical Society* 105 (1983) 22-26.
- ⁴⁹ C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, "A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite" *Magnetic Resonance in Chemistry* 44 (2006) 573-580.
- ⁵⁰ M.J. Moura, M.M. Figueiredo, M.H. Gil, "Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels" *Biomacromolecules* 8 (2007) 3823-3829.
- ⁵¹ A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani, "Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions" *Carbohydrate Polymers* 46 (2001) 39-47.
- ⁵² L. Chronopoulou, S. Lorenzoni, G. Masci, M. Dentini, A.R. Togna, G. Togna, F. Bordini, C. Palocci, "Lipase-supported synthesis of peptidic hydrogels" *Soft Matter* 6 (2010) 2525-2532.
- ⁵³ Z.R. Hinedi, S. Goldberg, A.C. Chang, J.P. yesinowski, "A ³¹P and ¹H MAS NMR study of phosphate sorption onto calcium carbonate" *Journal of Colloid and Interface Science* 152 (1992) 141-160.
- ⁵⁴ B.J. Lawrence, E.L. Maase, H.-K. Lin, S.V. Madhally, "Multilayer composite scaffolds with mechanical properties similar to small intestinal submucosa" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 88A (2009) 634-643.
- ⁵⁵ A.S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications" *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 3-12.
- ⁵⁶ B.K. Mann, "Biologic gels in tissue engineering" *Clinics in Plastic Surgery* 30 (2003) 601-609.
- ⁵⁷ I. Adekogbe, A. Ghanem, "Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering" *Biomaterials* 26 (2005) 7241-7251.

**V. *SCAFFOLDS* DE QUITOSANO
COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE BMP-2
PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO**

5.1. INTRODUCCIÓN

La experiencia clínica indica que en los procesos regenerativos naturales es fundamental la presencia de señales biológicas que dirijan, organicen y estimulen la respuesta tisular.¹⁻² Por este motivo, resulta de gran interés incorporar moléculas bioactivas en el soporte a implantar.³ Además, durante el proceso de regeneración tisular actúan diferentes factores de crecimiento en cada una de las fases del proceso.⁴ El conocimiento de la función específica de cada uno de dichos factores en el proceso regenerativo ha permitido la incorporación de algunas de esas moléculas en biomateriales utilizados en Ingeniería de tejido óseo con relativo éxito.⁵⁻⁶

5.1.1. IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA BMP-2

Aunque la habilidad autoreparadora del hueso se atribuyó durante mucho tiempo a su matriz inorgánica, en 1965 se descubrió de forma casual la formación ectópica de hueso en tejido muscular a partir de extractos de hueso desmineralizado.⁷ En estos experimentos, se implantaron en paralelo y por separado la fracción inorgánica y orgánica del hueso, esperando encontrar aquella como principal responsable de la formación de nuevo tejido óseo. Sorprendentemente, se demostró que la capacidad reparadora del hueso se debía a sustancias presentes en su fracción orgánica, denominadas en un principio factores morfogenéticos óseos y, posteriormente, proteínas morfogenéticas óseas (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs).⁸⁻⁹

En lo que se refiere a la proteína BMP-2, existe una extensa bibliografía en relación a su uso en diferentes soportes para distintas aplicaciones y localizaciones anatómicas.¹⁰⁻¹¹ La BMP-2 es la proteína que presenta mayor capacidad para inducir regeneración ósea y formación de hueso ectópico en vertebrados adultos, aunque su vida media en el organismo es muy corta.¹² Su uso se considera de gran interés en Ingeniería de tejidos, donde estudios clínicos recientes han demostrado que, cuando es liberada adecuadamente, resulta eficaz en la regeneración de tejido óseo.¹³⁻¹⁴ A nivel molecular, la BMP-2 desencadena la respuesta celular de regeneración tras su unión a receptores específicos de superficie, modificando la expresión génica e incidiendo sobre múltiples procesos celulares.¹⁵

La BMP-2 humana, como otras proteínas de este grupo, ha sido clonada con éxito y actualmente se puede obtener de manera recombinante utilizando diferentes sistemas de expresión (*recombinant human bone morphogenetic protein-2*, rhBMP-2).¹⁶

5.1.2. SOPORTES PARA INJERTOS ÓSEOS

Los implantes óseos se usan en todos los ámbitos de la cirugía ortopédica reconstructiva, desde el tratamiento de fracturas¹⁷⁻¹⁸ hasta complejas técnicas de cirugía tumoral para salvar extremidades.¹⁹⁻²⁰ En general, estos injertos deben cumplir una doble función: mecánica y biológica, aunque, dependiendo del resultado clínico que se busque, una de las funciones puede ser más importante que la otra. En cualquier caso, para alcanzar una correcta incorporación del injerto en el tejido nativo hay que tener en cuenta distintos aspectos, entre los que destacan, por ejemplo, el estado de la zona de implantación, la vascularización del injerto, la interfase hueso-injerto, la compatibilidad inmunogénica entre donante y huésped, las técnicas de conservación, las propiedades mecánicas (que dependen del tamaño, la forma y tipo de injerto utilizado)²¹ y otros factores locales y sistémicos relevantes (p.e. hormonas, uso de medicamentos, calidad ósea y enfermedades crónico-degenerativas del paciente).

Los implantes óseos pueden satisfacer tres funciones diferentes en el hueso nativo:

- **Osteogénicas:** relacionadas con la capacidad para inducir síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del propio injerto o del huésped. En este caso, el injerto necesita células capaces de generar hueso.²²
- **Osteoinductoras:** relacionadas con la capacidad para reclutar células progenitoras en la zona afectada e inducir su diferenciación hacia células de tejido óseo. Estos procesos están modulados por factores de crecimiento liberados desde la matriz del injerto, por ejemplo, proteínas morfogenéticas óseas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) y factores angiogénicos como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF).²³⁻²⁴
- **Osteoconductoras:** relacionadas con la capacidad del implante para permitir el crecimiento de tejido óseo de nueva formación en su superficie. Los procesos biológicos necesarios para la formación de este tejido (p.e. crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimatosas) vienen orquestados por mediadores biológicos procedentes del tejido nativo, no del implante, que simplemente proporciona una superficie biocompatible sobre la cual migra y crece tejido óseo nuevo.²⁵⁻²⁶

Idealmente, un implante óseo debería de satisfacer todas estas propiedades, además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica. Así, debería de ser posible preparar un biomaterial caracterizado por una matriz extracelular biomimética, capaz de formar una

adecuada interfase con el tejido nativo y portador de células con capacidad para diferenciarse a osteoblastos y/o factores de crecimiento que promuevan el reclutamiento de células osteogénicas, la mitogénesis, la diferenciación y la renovación celular. Desafortunadamente, ese material sintético ideal no existe todavía, aunque son numerosos los avances realizados en el desarrollo de biomateriales que satisfacen, al menos, alguna de esas propiedades, con un prometedor uso clínico futuro.

5.1.3. SCAFFOLDS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS

El conseguir una liberación controlada y localizada de moléculas activas proporciona una poderosa herramienta para facilitar la regeneración de tejidos.²⁷ En el caso particular del tejido óseo, la incorporación de factores de crecimiento en los *scaffolds* que sirven como soporte para el crecimiento celular presenta varias ventajas. Por un lado, se previene la degradación prematura del mismo al encontrarse inmovilizado en el biomaterial. Por otra parte, se facilita la liberación localizada en el área requerida y se reducen los efectos sistémicos o en otras partes del organismo no deseadas. Además, la liberación del factor desde el material puede ser más o menos prolongada en el tiempo, permitiendo así una mayor y mejor respuesta localizada. Finalmente, el material puede ser preparado en la forma y volumen deseado, pudiendo optimizarse en función de la aplicación terapéutica perseguida y el defecto concreto del hueso receptor.²⁸⁻²⁹

Para que un *scaffold* se convierta en un sistema adecuado para la liberación de sustancias bioactivas en los procesos de regeneración tisular es necesario que se cumplan varios requisitos, entre los que se encuentran: (1) una capacidad de carga adecuada, (2) una distribución homogénea de la sustancia bioactiva, (3) una afinidad de unión con la sustancia bioactiva suficientemente alta como para estabilizarla en el soporte, pero, al mismo tiempo, suficientemente baja como para permitir su liberación, (4) un control más o menos específico de la cinética de liberación y (5) el mantenimiento de su estructura y actividad a lo largo del tiempo. La incorporación de estas sustancias bioactivas (biomoléculas o agentes activos lábiles) en los *scaffolds* necesita de procedimientos especiales para la fabricación del material, ya que éstas pueden quedar inactivadas por su exposición a altas temperaturas o a un entorno químico hostil.

En lo que se refiere a la BMP-2, existe una extensa bibliografía en relación a los diferentes materiales utilizados como sistemas de liberación, que en términos generales se pueden agrupar

en polímeros naturales, polímeros sintéticos, fosfatos de calcio y *composites*.³⁰ Como ejemplo concreto, ya existen en el mercado matrices de colágeno portadoras de BMP-2 para su uso en regeneración de hueso en fracturas de tibia y fusión de vértebras de la columna vertebral (*InfuseTM*).³¹ Entre los polímeros naturales biodegradables más usados se encuentra el quitosano. Su capacidad para formar hidrogeles ha despertado un gran interés para aplicaciones biomédicas.³²⁻³³ En particular, existen diversos estudios de inmovilización y liberación controlada de proteínas y factores de crecimiento en cápsulas y láminas delgadas (*films*) de quitosano con aplicabilidad en regeneración tisular.³⁴⁻³⁵

Otro aspecto a tener en cuenta en el uso del quitosano es su mecanismo de biodegradación. La degradación *in vivo* del quitosano se produce por hidrólisis enzimática mediada por lisozima, una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano. Aunque este mecanismo de degradación no está completamente elucidado, parece que la estructura del polímero influye en la accesibilidad de la enzima al mismo y, en consecuencia, en su degradación. El estudio y análisis de los factores que afectan a la biodegradación son importantes no sólo a la hora de determinar si ésta tiene (o no) lugar, sino también porque la velocidad de biodegradación influye decisivamente en la aplicabilidad del material en un entorno concreto. Además, cuando el material es portador de moléculas activas (p.e. proteínas o DNA), la velocidad de degradación influye de forma crítica en la liberación de éstas al medio ([Fig. 5.1](#)).

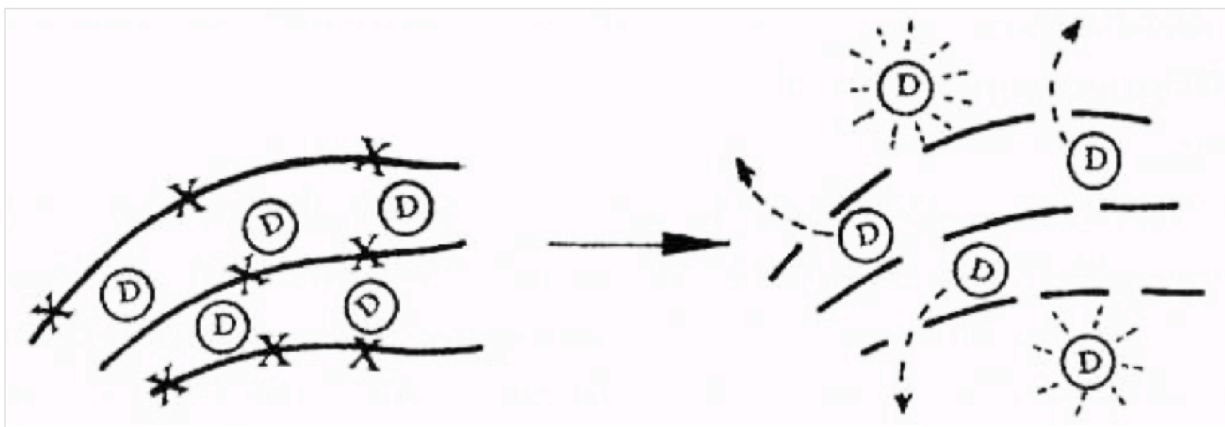


Figura 5.1. Esquema de la degradación de las cadenas de quitosano y posterior liberación de compuestos activos embebidos en la matriz de polímero.³⁶

5.1.4. SCAFFOLDS DE QUITOSANO CON LA PROTEÍNA BMP-2

En este capítulo se presenta un estudio de preparación y caracterización de *scaffolds* multifuncionales de quitosano en los que se inmovilizan la proteína rhBMP-2 y sales de fosfato de calcio amorfo (ACP) con el propósito de promover la regeneración de tejido óseo. En particular, se describe cómo el aumento gradual del pH en el medio acuoso, resultante de la descomposición enzimática de la urea ([ver apartado 4.1.3](#)),³⁷ promueve la gelificación del quitosano, la inmovilización de la proteína y, al mismo tiempo, la precipitación de las sales de ACP. A partir de estas mezclas, se preparan los hidrogeles que se procesan mediante metodología ISISA para obtener *scaffolds* macroporosos de quitosano con rhBMP-2 y ACP, que se caracterizan como sistemas de liberación controlada de la proteína rhBMP-2. Para la preparación de estos soportes se emplean dos tipos de quitosano que varían en su peso molecular (Q y QD), estudiando así posibles diferencias en la liberación de proteína causadas por las características del polímero.³⁸⁻³⁹ A continuación, se analiza la liberación de BMP-2 y se llevan a cabo estudios preliminares *in vitro* con la línea premitótica C2C12 e *in vivo* mediante implantes en hueso tibial de conejo para evaluar la potencialidad de estos *scaffolds* como biomateriales para regeneración de tejido óseo.

Este trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. López Lacomba del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid.

5.2. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO

Como se ha mencionado, el quitosano es un polímero natural y, por tanto, presenta una gran variabilidad en cuanto a sus propiedades químico-físicas. Debido a su carácter policationico es un polímero soluble en medios acuosos ácidos. Considerando que la velocidad de degradación del quitosano influye en la liberación de la proteína, se preparan *scaffolds* con dos tipos de quitosano (Q y QD) caracterizados por un distinto peso molecular y, por tanto, una distinta velocidad de degradación.

Se ha demostrado que el quitosano se puede depolimerizar mediante diferentes mecanismos, como hidrólisis ácida, radiación UV, microondas o degradación térmica.⁴⁰⁻⁴¹ En este trabajo, se emplea quitosano QD obtenido mediante un proceso de degradación térmica en autoclave (121 °C, 30 min) a partir de quitosano comercial (Q) ([ver apartado 3.2.1.1.1](#)). Se observa que la degradación del polímero da lugar al cambio de color de la disolución de partida (de amarilla a

marrón). Las viscosidades de las disoluciones de Q y QD se miden mediante un viscosímetro rotacional (*Brookfield*), registrando el esfuerzo necesario para producir una determinada velocidad angular, a 20 °C (ver apartado 3.2.1.1.6). Efectivamente, la viscosidad estática de las disoluciones de quitosano a una concentración de 2.83% p/p en ácido acético es menor para la disolución de quitosano depolimerizado QD (321 cP), que para la de quitosano Q (1323 cP). Estos dos tipos de quitosano se caracterizan adicionalmente mediante determinación del contenido en cenizas, grado de humedad y peso molecular (tabla 5.1).

Tabla 5.1. Propiedades fisico-químicas de los dos tipos de quitosano empleados en estos estudios.

Tipo de quitosano	Cenizas (%)	Humedad (%)	M _w (kDa)
Quitosano (Q)	1.63	9.49	419
Quitosano depolimerizado (QD)	1.05	5.73	305

A continuación se procede a estudiar los dos tipos de quitosano mediante análisis térmico. En la figura 5.2 se muestran los termogramas de Q y QD, y sus respectivas derivadas, obtenidos a partir del análisis termogravimétrico. Las curvas calorimétricas de los dos polímeros muestran dos eventos térmicos: la pérdida de humedad inicial y el proceso de degradación posterior. Además, en el segundo evento térmico, se observa cómo la temperatura de máxima rapidez de descomposición para el quitosano Q (307.9 °C) es mayor que la correspondiente para el quitosano depolimerizado QD (295.7 °C). Este comportamiento se puede atribuir a un mayor grado de cristalinidad de Q que se refleja en una mayor estabilidad térmica. Está demostrado que un compuesto de mayor cristalinidad presenta una estructura molecular más rígida y, por consiguiente, necesita una mayor energía para su descomposición.⁴² De esta forma, la disminución en la temperatura de descomposición de QD se puede atribuir a una menor estabilidad térmica como consecuencia de la reducción del grado de polimerización de este biopolímero.

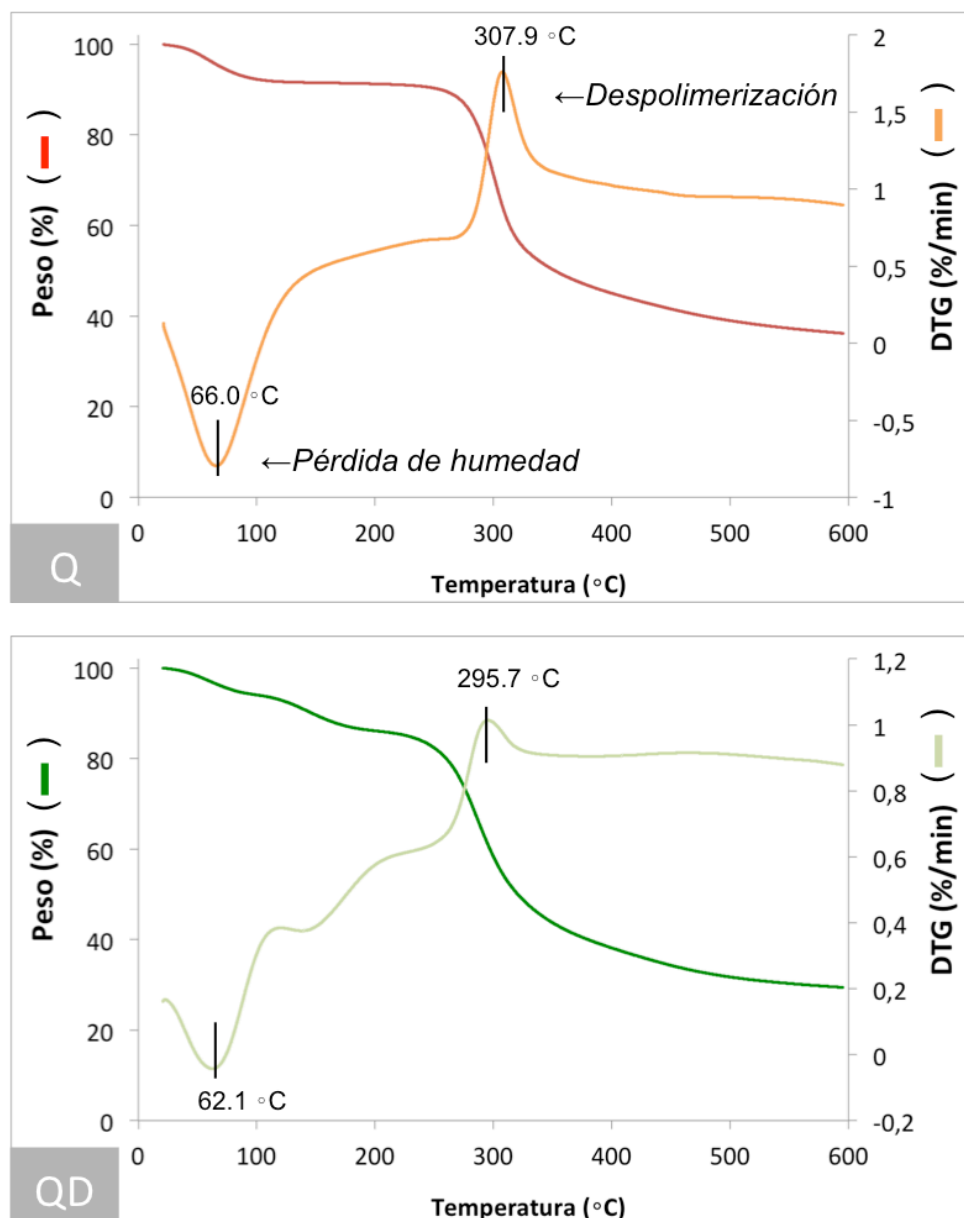


Figura 5.2. Análisis termogravimétrico de los polímeros Q (arriba) y QD (abajo) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y atmósfera de nitrógeno.

5.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS

La preparación de *scaffolds* 3D porosos de quitosano con inmovilización de fosfato de calcio y BMP-2 se lleva a cabo mediante proceso criogénico ISISA (ver apartado 3.2.1.4.3). De modo análogo a lo que se ha descrito en el capítulo anterior, en primer lugar se preparan distintas disoluciones de los dos tipos de quitosano (con y sin proteína y fosfato de calcio), añadiendo además en este caso 45 U/mL de ureasa. Las disoluciones se recogen en jeringuillas

de insulina antes de su gelificación y se someten a tratamiento térmico para formar hidrogeles (24 horas a 37 °C). A continuación, estas jeringuillas se congelan por inmersión a velocidad constante (0.9 mm/min) en un baño de nitrógeno líquido (-196 °C) y se liofilizan. Del liofilizado de las muestras se obtienen monolitos con la forma y tamaño de las jeringuillas utilizadas como molde en el proceso de congelación. Una vez descartadas las partes densa y celular de los *scaffolds* (ver apartado 3.2.1.5), se procede a su caracterización. Respecto al capítulo anterior, en este caso se elige únicamente la concentración de ureasa de 45 U/mL porque permite un proceso de gelificación más rápido. En la [tabla 5.2](#) se resumen las muestras preparadas en este trabajo.

Tabla 5.2. Muestras preparadas en este trabajo.

POLÍMERO	SIN	ADITIVO		
	ADITIVO	<i>Fosfato de calcio</i>	<i>rhBMP-2</i>	<i>Fosfato de calcio+rhBMP-2</i>
<i>Quitosano (Q)</i>	Q	QP	QB	QPB
<i>Quitosano depolimerizado (QD)</i>	QD	QDP	QDB	QDPB

5.3.1. MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LAS MATRICES

Los monolitos obtenidos mediante metodología ISISA muestran una morfología macroporosa homogénea a lo largo de toda la estructura ([Fig. 5.3](#)). Las micrografías de SEM de los diferentes *scaffolds* preparados revelan una estructura 3D totalmente reticulada, con un menor tamaño de poro en soportes preparados con quitosano depolimerizado (serie QD), en comparación con los preparados a partir de quitosano comercial (serie Q). Como se ha comentado, la menor solubilidad del quitosano comercial respecto al quitosano depolimerizado hace que los procesos de adsorción/desorción entorno a los cristales de hielo sean más favorables en el primero, facilitando así la segregación y, por tanto, la formación de poros mayores. Dentro de una misma serie, no existen diferencias estructurales significativas (entre soportes QP, QB y QPB o entre QDP, QDB y QDPB), probablemente debido a que el fosfato de calcio y proteína añadidos sólo representan un pequeño porcentaje en peso del *scaffold* resultante.

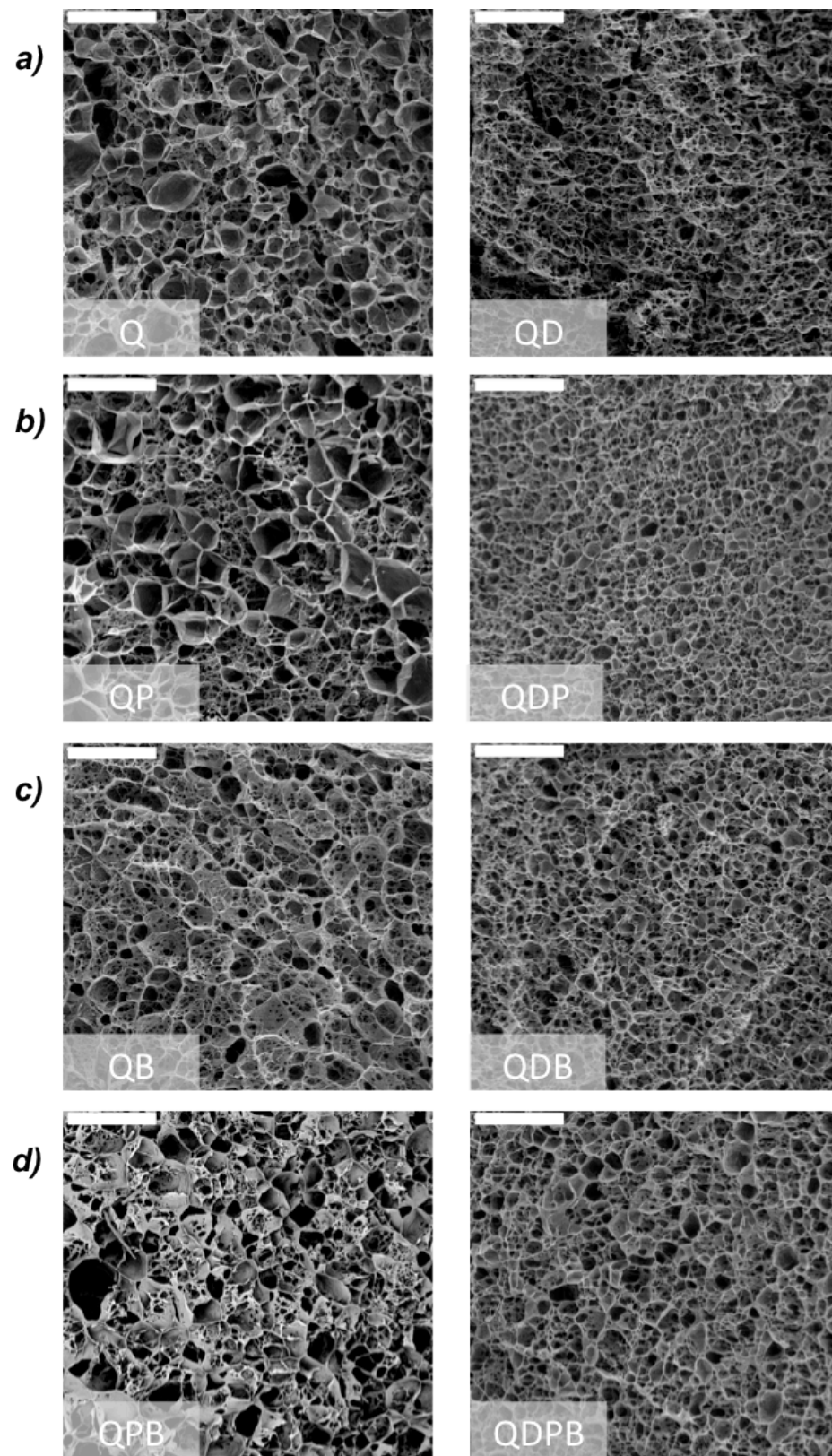


Figura 5.3. Micrografías de SEM de secciones transversales (perpendiculares a la dirección de congelación) de *scaffolds* de quitosano (columna izquierda) y quitosano depolimerizado (columna derecha): a) Q y QD; b) QP y QDP; c) QB y QDB; d) QPB y QDPB. La barra de escala representa 200 μm en todas las imágenes.

Dado que el proceso de preparación de los *scaffolds* es similar al descrito en el capítulo anterior, se consideró muy probable la obtención de nanopartículas de ACP durante el proceso de precipitación, hecho que se confirma con análisis de TEM. Para una correcta visualización, las muestras son tratadas previamente mediante plasma-ionización para eliminar el polímero de la matriz (ver apartado 3.2.1.5.2). Las micrografías de TEM obtenidas evidencian la formación de cristales de forma granular y de tamaño nanométrico típicos de ACP en los *scaffolds* preparados con los dos tipos de quitosano (Fig. 5.4). Además, la imposibilidad de sacar imágenes de difracción de estos cristales confirma el carácter amorfo de las partículas de fosfato de calcio precipitadas en estas matrices, con ambos tipos de quitosano.

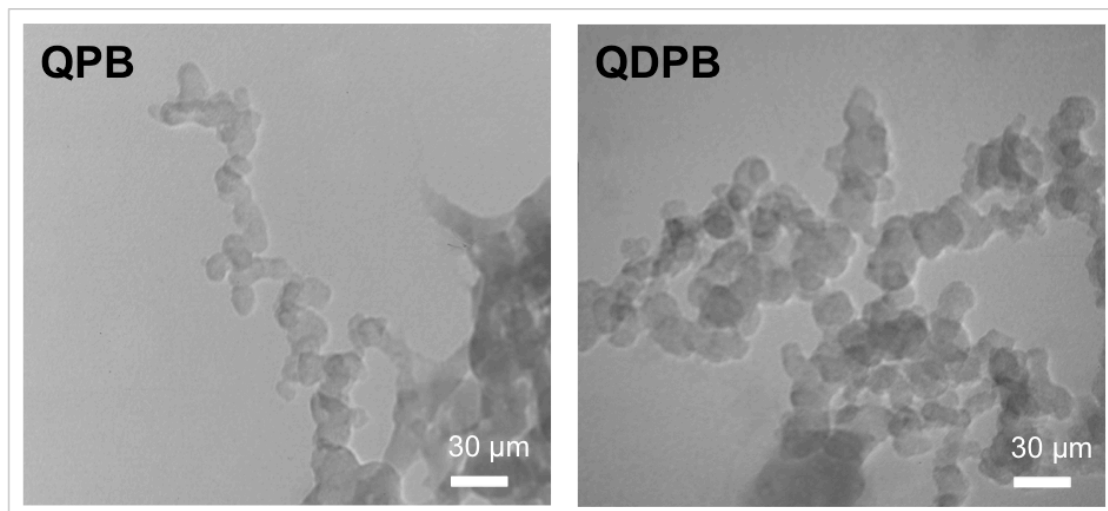


Figura 5.4. Micrografías TEM que muestran la formación de ACP en los *scaffolds* QPB y QDPB.

5.3.2. PROPIEDADES MECANICAS

Mediante ensayo de tracción en una dimensión, se aplica sobre el material una velocidad de deformación constante y se mide la fuerza necesaria para cada deformación, típicamente hasta que el material se fractura. La fuerza máxima es la resistencia a la tensión del material. Finalmente, se obtiene una curva que muestra la deformación del material (eje de abscisas) frente a la tensión requerida para causar esa deformación (eje de ordenadas).

Los valores de resistencia a la tensión de los diferentes *scaffolds* de quitosano comercial, se determinan a partir del análisis de las curvas de tensión-deformación obtenidas. En la [figura 5.5](#) se representa la evolución de esta variable para cada uno de los *scaffolds* estudiados.

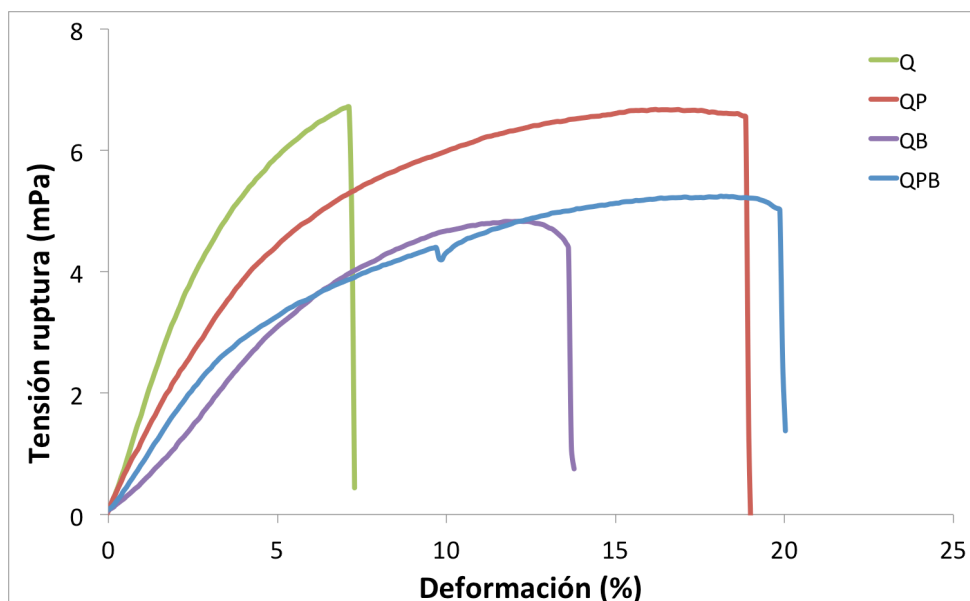


Figura 5.5. Resistencia a tensión de diferentes *scaffolds* de quitosano comercial (Q, QP, QB y QPB).

Análogamente a los resultados mostrados en el capítulo anterior, los *scaffolds* analizados presentan un comportamiento mecánico gobernado por la ley de Hooke, con una zona de deformación elástica inicial, seguida por una zona de elongación de la muestra en donde la carga se mantiene constante y, tras la cual, tiene lugar la ruptura de la matriz.⁴³ Como ya se había observado anteriormente ([ver apartado 4.5.2](#)), la presencia del fosfato de calcio induce un aumento de la resistencia mecánica de los *scaffolds*. Curiosamente, la presencia de la proteína también parece favorecer un modesto aumento de la resistencia mecánica ([Tabla 5.3](#)).

El proceso de degradación térmica al que se somete el quitosano para la preparación de las muestras QD causa una reducción dramática de la resistencia mecánica de las matrices resultantes, motivo por el cual los soportes QD se han excluido de estos estudios.

Tabla 5.3. Propiedades mecánicas de las matrices preparadas con quitosano comercial (Q, QP, QB y QPB). Los datos representan la media \pm error, incluyendo desviación estándar y error instrumental.

Muestra	Módulo (GPa)	Tensión máxima (MPa)	Carga máxima (N)	Deformación ruptura (%)
<i>Scaffold</i> Q	0.12 \pm 0.02	4.92 \pm 0.10	7.37 \pm 1.00	9.97 \pm 1.00
<i>Scaffold</i> QB	0.07 \pm 0.02	4.80 \pm 0.50	7.25 \pm 0.90	13.61 \pm 0.70
<i>Scaffold</i> QP	0.12 \pm 0.01	5.50 \pm 0.80	8.22 \pm 0.80	17.95 \pm 0.80
<i>Scaffold</i> QPB	0.05 \pm 0.03	3.30 \pm 0.90	4.97 \pm 1.20	21.36 \pm 0.90

5.3.3. PROPIEDADES DE HINCHAMIENTO

Dado que la aplicación biológica de estos *scaffolds* implica la presencia de disoluciones acuosas, también se mide la habilidad de estos materiales para retener agua (fenómeno de hinchamiento) (ver apartado 3.2.1.5.4). En la figura 5.6, se muestra de forma representativa cómo el soporte mantiene su forma después de haber estado en contacto con tampón fosfato salino (PBS 0.1M, pH= 7.0) a 37 °C.

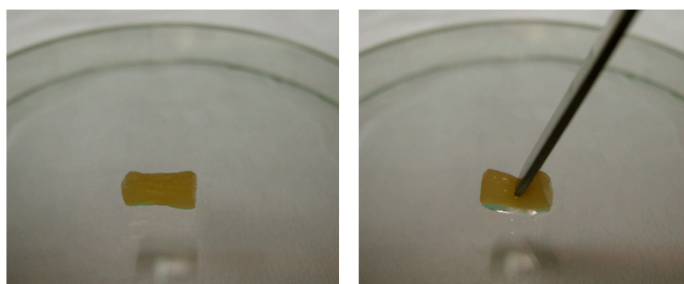


Figura 5.6. Imagen del hinchamiento en PBS a 37°C de un soporte representativo de quitosano depolimerizado que contiene fosfato de calcio y proteína (QDPB).

De forma similar a lo descrito en el capítulo precedente (ver apartado 4.5.3), en todos los *scaffolds* se alcanza el hinchamiento máximo (o de equilibrio) en los primeros 5-10 minutos, manteniéndose después estable en el tiempo. Como era de esperar, se observa un pequeño aumento del grado de hinchamiento para las muestras preparadas con quitosano depolimerizado (QD) (Tabla 5.4). El menor peso molecular de este quitosano determina una mayor capacidad de captación de agua en el soporte. Aunque en general no se han encontrado diferencias notables entre las distintas muestras preparadas con el mismo tipo de quitosano, sí se aprecia una sutil diferencia en aquellos *scaffolds* con fosfato de calcio, que, al presentar una estructura más rígida, alcanzan un menor grado de hinchamiento. En general, la entrada de líquido en el interior del *scaffold* alcanza un límite o grado máximo de hinchamiento de entre el 90-97%.

Tabla 5.4. Grado de hinchamiento de matrices de quitosano en tampón fosfato a 37 °C.

	<i>Grado de hinchamiento (%)</i>	
	<i>Scaffold de Q</i>	<i>Scaffold de QD</i>
Polímero	94.0	96.9
Polímero+ACP	90.0	93.4
Polímero+BMP-2	92.3	96.2
Polímero+ACP+BMP-2	91.9	95.6

5.4. ESTUDIO DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE BMP-2

El grado de hinchamiento que experimentan los *scaffolds* de quitosano en medio acuoso los hace candidatos válidos para ensayar la liberación de rhBMP-2, ya que posibilita la difusión de la proteína desde la matriz del material. Para ello, los distintos *scaffolds* de quitosano liofilizados y cargados con la proteína rhBMP-2 (*scaffolds* QB, QPB, QDB, QDPB) se sumergen en tampón fosfato salino (PBS) para permitir la difusión de rhBMP-2 hacia el medio de liberación. El PBS se retira en su totalidad a distintos tiempos y se reemplaza por tampón fresco. La liberación de la proteína se sigue durante un total de 12 días. Para detectar la cantidad de proteína rhBMP-2 liberada en el medio se utiliza la técnica ELISA de tipo “sándwich”,⁴⁴⁻⁴⁵ basada en la unión de la proteína a dos anticuerpos que la reconocen específicamente. El primer anticuerpo (de captura) está anclado a la base del pocillo de la placa y captura la proteína disuelta en el medio. Una vez reconocida la proteína y fijada al pocillo a través de este primer anticuerpo, se adiciona un segundo anticuerpo (de detección, marcado con biotina) que también reconoce específicamente la proteína y se une a ella. A continuación se añade a la solución avidina-HRP (*Horse Radish Peroxidase*), que se une al anticuerpo de detección a través del reconocimiento de alta especificidad de la biotina. Tras un proceso de lavado, se añade el sustrato TMB (disolución de tetrametilbenzidine, H_2O_2 , etc.), que será oxidado por la HRP para dar lugar a un compuesto amarillo cuya absorbancia en el UV-visible será proporcional a la cantidad de proteína reconocida por el “sándwich” de anticuerpos (Fig. 5.7).

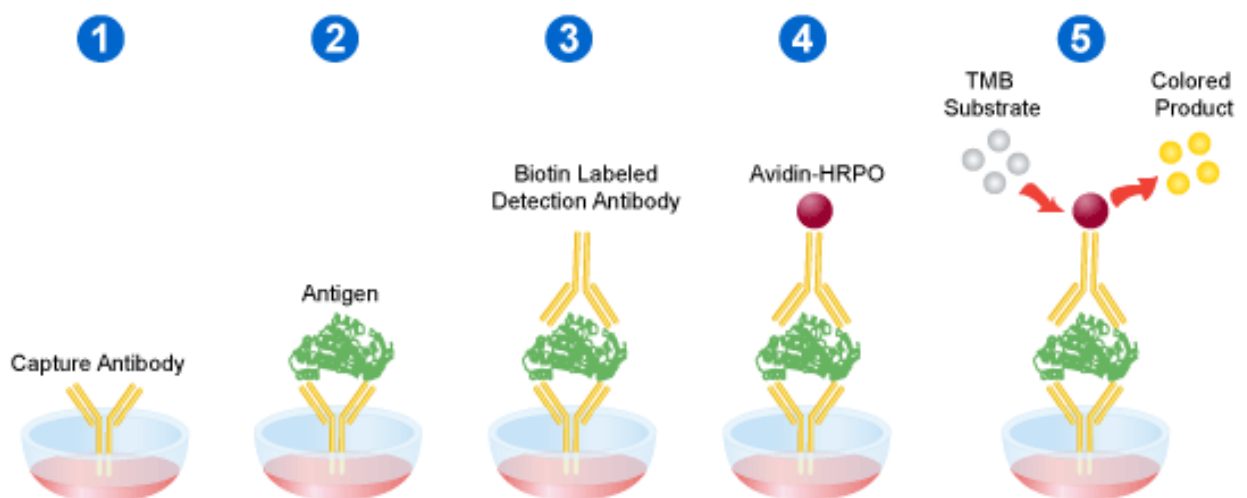


Figura 5.7. Esquema de funcionamiento de la técnica ELISA de tipo “sándwich”.

En las [figuras 5.8 y 5.9](#), se muestran los gráficos relativos a la liberación acumulada de rhBMP-2 de los distintos *scaffolds* de quitosano (Q y QD, respectivamente). En todos los casos, la liberación de la proteína se produce mayoritariamente durante las primeras 5-6 horas (*Burst release*). A partir de ese momento, la velocidad de liberación disminuye paulatinamente hasta llegar a las 72 horas, momento en el cual se maximiza la concentración total de rhBMP-2 liberada. Sin embargo, esta concentración representa sólo un 30%, aproximadamente, de la cantidad total de proteína incorporada inicialmente en los *scaffolds* (10 µg). La cantidad de proteína restante no parece ser liberada dentro de los 12 días evaluados. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que el hinchamiento del soporte no fuera suficiente para liberar toda la proteína atrapada en las zonas más internas del *scaffold*. En este caso, serían necesarios tiempos más largos de liberación para asegurar una mayor degradación del polímero y, en consecuencia, la liberación de la proteína restante. Por otro lado, parece apreciarse una ligera disminución en la cantidad de proteína liberada, así como de la velocidad inicial de liberación, a partir de los *scaffolds* que contienen fosfato de calcio (QPB y QDPB), lo que podría ser indicativo de una posible interacción de la rhBMP-2 con el fosfato de calcio.

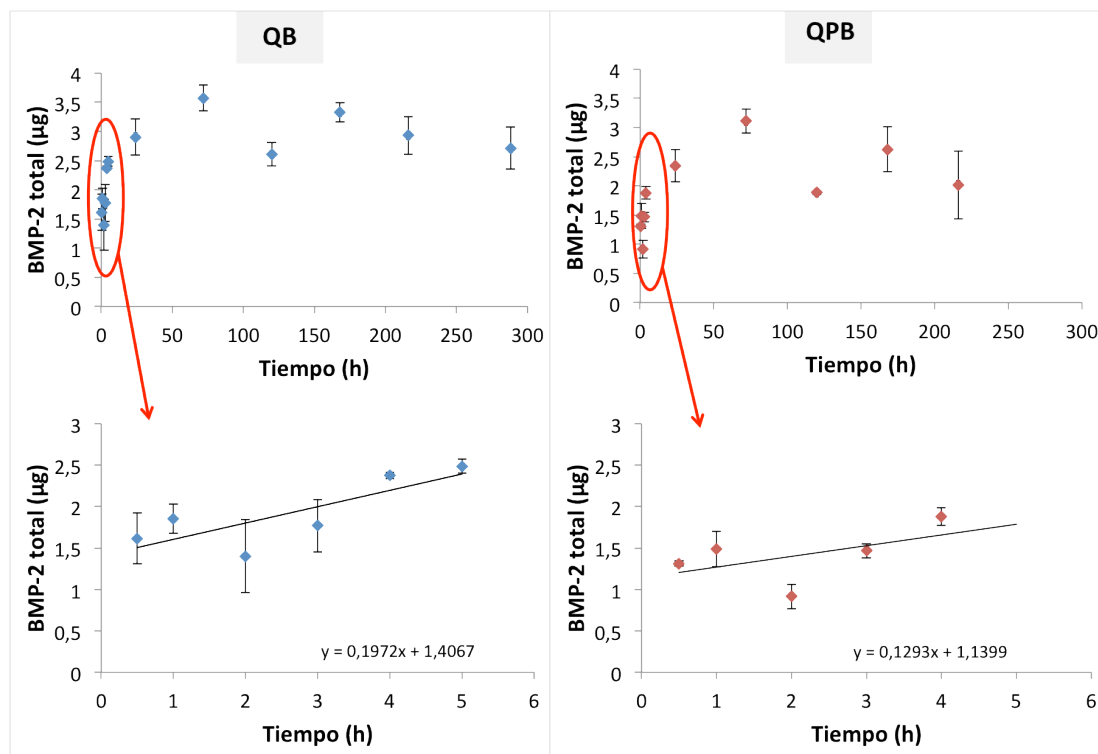


Figura 5.8. Perfiles de liberación acumulada de rhBMP-2 a partir de los *scaffolds* QB (romboedros azules) y QPB (romboedros rojos) medidos mediante ELISA.

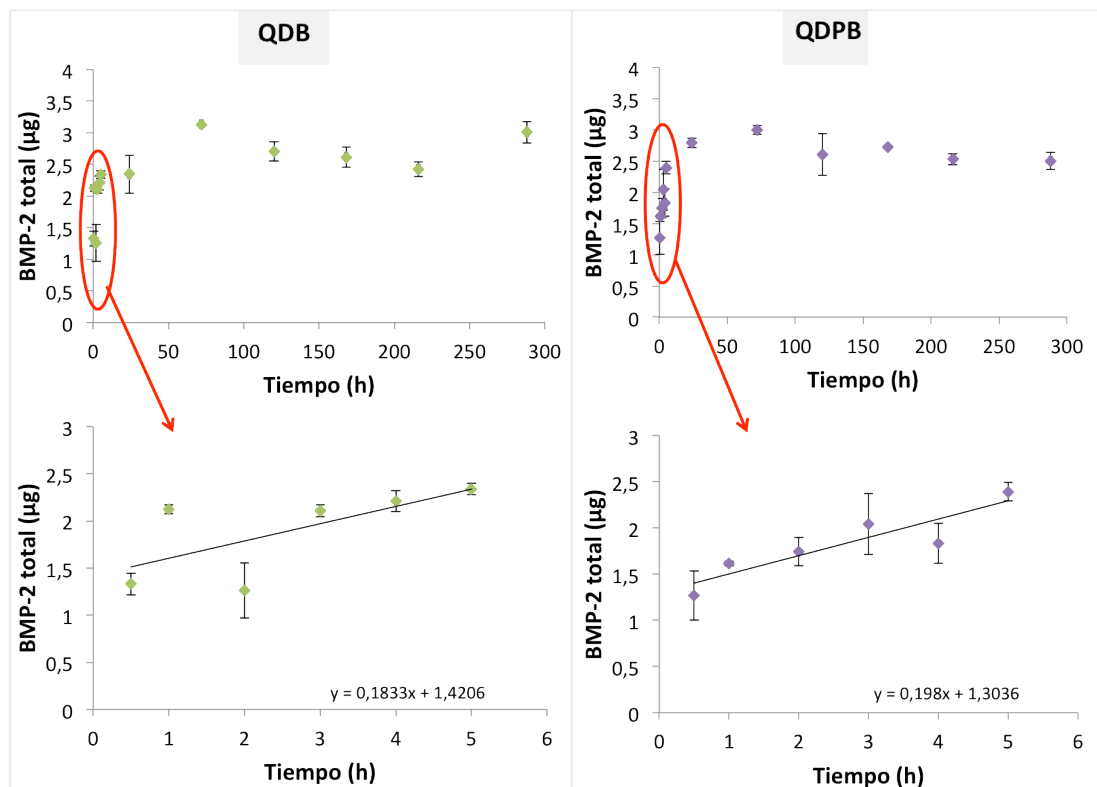


Figura 5.9. Perfiles de liberación acumulada de rhBMP-2 a partir de los *scaffolds* QDB (romboedros verdes) y QDPB (romboedros violetas) medidos mediante ELISA.

5.5. ESTUDIOS PRELIMINARES DE BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* E *IN VIVO*

5.5.1. ESTUDIO DE ADHESIÓN CELULAR

Con el fin de tener una idea general sobre la capacidad de adhesión de las células C2C12 sobre los *scaffolds* de quitosano (Q), se utiliza un marcaje con calceína. Con este método, la escisión de la calceína en contacto con las esterasas intracelulares en las células viables induce un aumento en la fluorescencia verde de esta molécula que permite su visualización en el microscopio confocal. Tal y como se observa en la figura, las células C2C12 son capaces de adherirse a la superficie del scaffold (24h) (Fig. 5.10-A), mostrando una morfología más extendida a tiempos más largos de cultivo (96 y 168h) (Fig. 5.10-B y C, respectivamente).

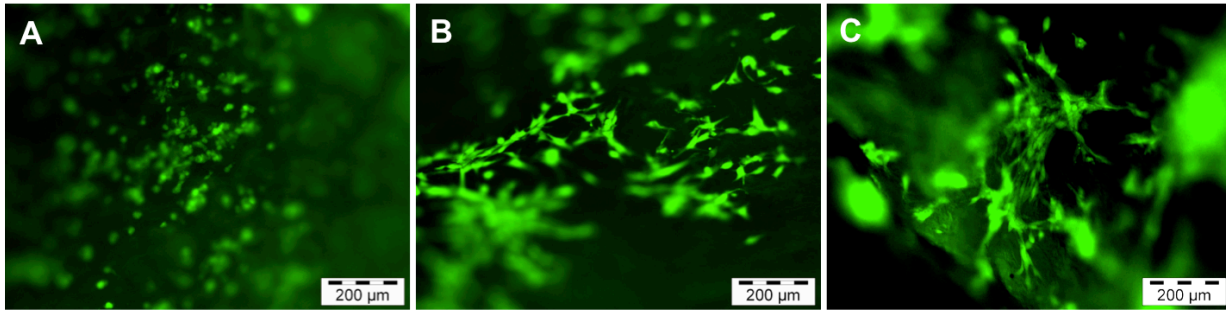


Figura 5.10. Estudios de adhesión celular de cultivos de células C2C12 sobre *scaffolds* de quitosano Q después 24h (A), a 96h (B) y 168h (C).

5.5.2. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

A continuación, se evalúa la adhesión y proliferación celular sobre los soportes de quitosano cargados con la proteína rhBMP-2. Como tipo celular, se escoge la línea premitótica C2C12 de ratón, cuya capacidad de proliferación y diferenciación sobre soportes 3D ha sido anteriormente demostrada en otras colaboraciones con el grupo del Dr. Lacomba (Universidad Complutense de Madrid).⁴⁶ Para evaluar la proliferación celular sobre los *scaffolds*, se utiliza el ensayo Alamar Blue (*Invitrogen*). Este método colorimétrico se basa en la adición del reactivo *Resazurin* (de color azul, no fluorescente) al cultivo celular y la posterior medición de la fluorescencia emitida como consecuencia de su conversión a *Resorufin* (de color rojo, altamente fluorescente) tras su reducción por las enzimas metabólicas de las células. De este modo, los cultivos con un mayor número de células metabólicamente activas emitirán una mayor fluorescencia que los cultivos no viables, con mayor contenido de células muertas. Las células C2C12 se siembran sobre los *scaffolds* a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células por *scaffold*. Los valores de fluorescencia se convierten a número de células tras interpolar en una recta patrón obtenida con suspensiones de células de concentración conocida.

La [figura 5.11](#) muestra las cinéticas de proliferación de las células C2C12 sobre los *scaffolds* de quitosano comercial (Q). Como puede observarse, las células proliferan activamente durante los primeros 3 días, coincidiendo con la liberación máxima de la rhBMP-2, tal y como indicaban los estudios de liberación de la proteína anteriormente descritos. A partir del día 3, los cultivos se estabilizan, con excepción de aquellos sobre las matrices que incorporan fosfato de calcio y rhBMP-2 (QHB), en los que las células continúan proliferando activamente hasta los 5 días. Este resultado puede deberse a un efecto sinérgico de los dos componentes, ya que la estimulación de la proliferación de cualquiera de ellos por separado (QB y QH) es mucho más

discreta. En el caso de los soportes preparados con quitosano depolimerizado (QD, QDP, QDB, QDPB), no parece detectarse una proliferación celular significativa ni efecto alguno ligado a la presencia de la proteína o al fosfato de calcio (Fig. 5.11-B). Es posible que la depolimerización del polímero, al igual que favorece su solubilidad por deacetilación, también induzca la aparición de grupos funcionales disponibles en la superficie del *scaffold* que establezcan interacciones no favorables con los receptores de membrana de las células C2C12. En este contexto, los procesos de adhesión y proliferación celular se verían altamente afectados al quedar comprometida la interacción célula-material. En consecuencia, los *scaffolds* preparados con quitosano QD han sido descartados para estudios posteriores al no mostrar una adecuada biocompatibilidad.

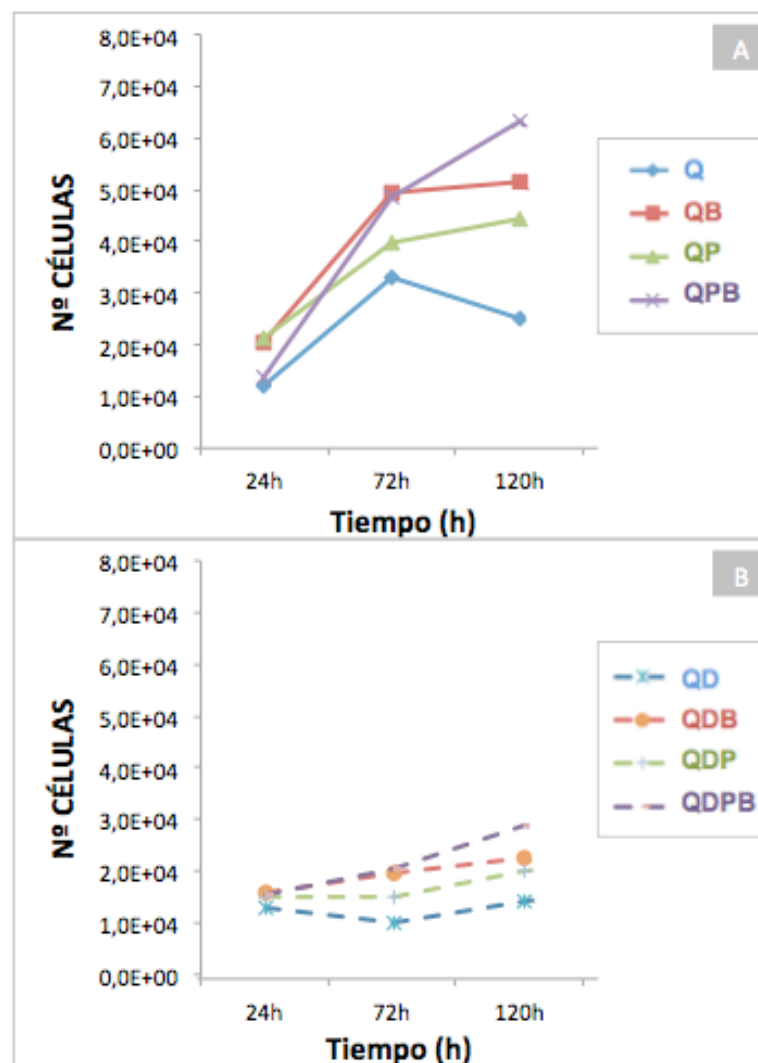


Figura 5.11. Ensayos de proliferación de células C2C12 sobre *scaffolds* de (A) quitosano (Q, QP, QB y QPB) y (B) quitosano degradado (QD, QDP, QDB y QDPB).

5.5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA

Estudios previos *in vitro* han demostrado la capacidad de la proteína rhBMP-2 para inducir diferenciación celular hacia fenotipo osteoblástico.⁴⁷⁻⁴⁸ En este sentido, la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP) se ha convertido en uno de los marcadores funcionales más utilizados para determinar esta diferenciación, siendo especialmente indicado para las etapas más tempranas del proceso. La actividad de esta enzima está relacionada, por lo tanto, con el inicio del proceso de maduración ósea y calcificación. En células C2C12, su expresión basal es prácticamente nula en ausencia de un estímulo osteogénico específico.

Con el fin de comprobar si la proteína atrapada en el *scaffold* se mantiene activa y puede, por lo tanto, actuar como factor de diferenciación ósea, se evalúa la actividad de la ALP como marcador de la respuesta de diferenciación celular en presencia de rhBMP-2. La cuantificación de esta enzima se realiza empleando un método colorimétrico basado en la conversión de p-nitrofenilfosfato (prácticamente incoloro) a p-nitrofenolato (color amarillo intenso) catalizada por la enzima ALP (Fig. 5.12).

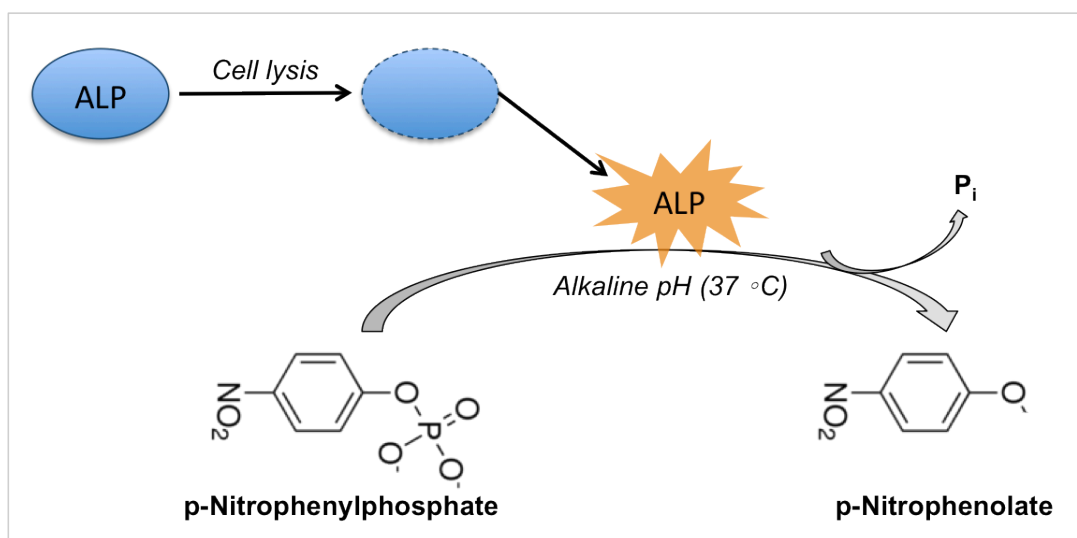


Figura 5.12. Esquema de la determinación colorimétrica de la actividad ALP celular.

Para la realización de estos estudios, los *scaffolds* de quitosano con rhBMP-2 incorporada (QB) se colocan en medio de cultivo para liberar la proteína (*scaffolds* similares sin rhBMP-2 se usan como blanco). El medio de cultivo se recoge diariamente durante un total de 4 días (coincidiendo con la liberación máxima de la proteína) y, a continuación, se incuba con cultivos

de células C2C12. A distintos tiempos de cultivo, las células se lisan para extraer la ALP y se evalúa su actividad por el método indicado anteriormente. Como se muestra en la [figura 5.13](#), la actividad de ALP en las células C2C12 se incrementa progresivamente con el tiempo de cultivo en presencia de la proteína rhBMP-2, a pesar de tratarse sólo de un 30% de la proteína incorporada.

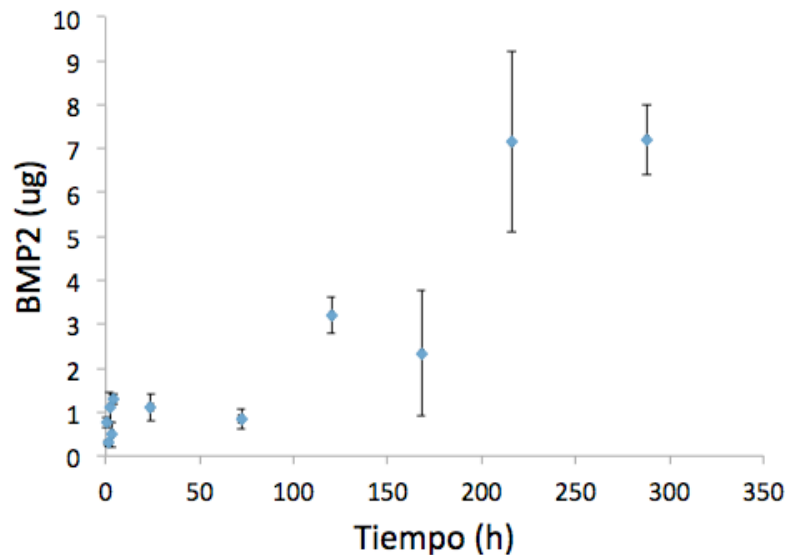


Figura 5.13. Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina en cultivos de células C2C12 incubadas con el medio de liberación de *scaffolds* de quitosano con rhBMP-2 (QB).

5.5.4. ESTUDIOS PRELIMINARES *IN VIVO*

A continuación, con el objetivo de evaluar la capacidad de estos *scaffolds* para inducir la formación de hueso *in vivo*, se realizan estudios preliminares con *scaffolds* de quitosano, con y sin proteína rhBMP-2 (QB y Q, respectivamente), mediante implantes en la meseta tibial de conejos. En primer lugar, se anestesian los animales y se realizan las incisiones en la zona plana del hueso tibial. A continuación se procede a implantar los *scaffolds* cilíndricos (0.5 mm de diámetro y 2 mm de grosor) en dichas incisiones ([Fig. 5.14-B](#)). Como control negativo, se estudia la regeneración de tejido óseo en incisiones practicadas y cerradas en ausencia de cualquier tipo de soporte ([Fig. 5.14-A](#)). A las cinco semanas de la realización del implante, los animales se sacrifican para llevar a cabo un estudio histológico de la zona en la que se ha realizado el implante.

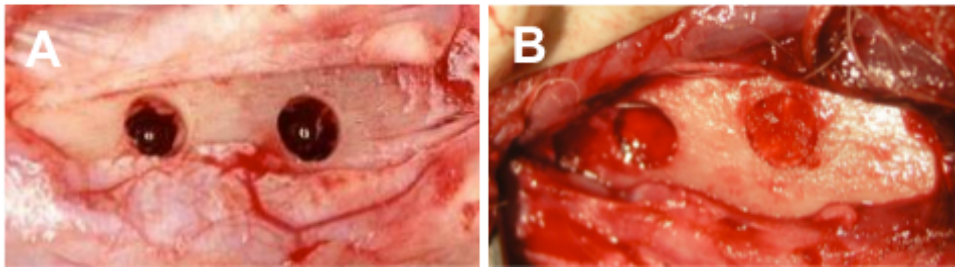


Figura 5.14. Imágenes de las incisiones practicadas en la meseta del hueso tibial de conejo: (A) sin *scaffold* de relleno (control negativo) y (B) con implante de *scaffold* QB.

Las [figuras 5.15-A/C](#) y [5.15-B/D](#) muestran el aspecto macroscópico de las secciones de hueso tibial con los implantes de Q y QB, respectivamente. En las incisiones rellenas con los *scaffolds* QB ([Fig. 5.15-B](#)) se aprecia una mayor formación de tejido por encima de la incisión practicada, resultado aún más evidente en las imágenes de Rayos X ([Fig. 5.15-D](#)). La presencia de la rhBMP-2 en los *scaffolds* QB parece ser, por lo tanto, capaz de inducir una mayor formación de tejido en la zona de la incisión en comparación con la incisiones rellenas con *scaffolds* sin proteína ([Fig. 5.15-C](#)).

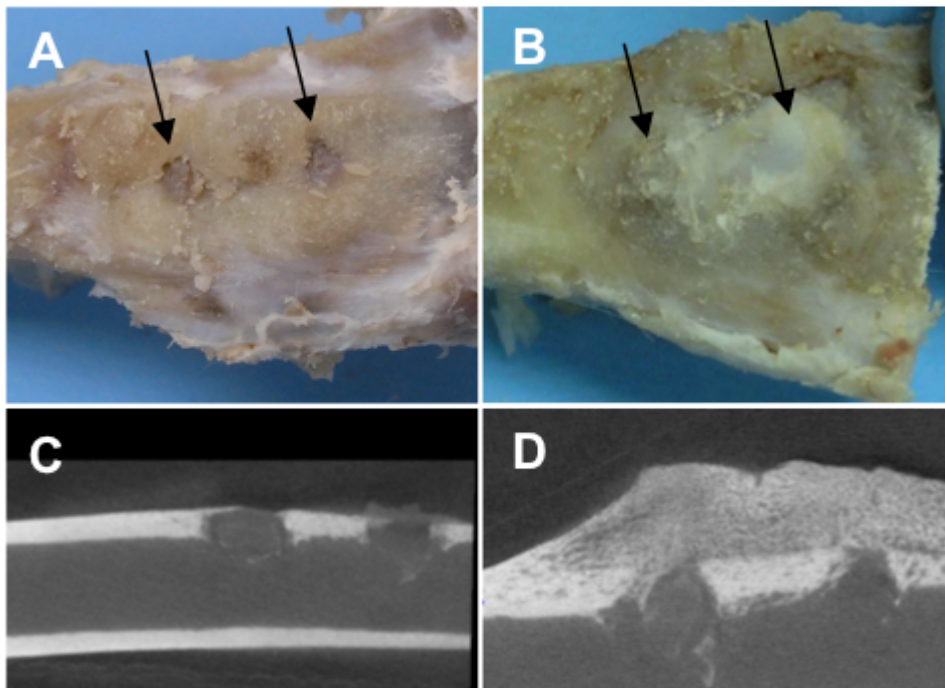


Figura 5.15. Imágenes macroscópicas de los explantes de meseta tibial en los que se han implantado *scaffolds* Q (A,C) y QB (B,D) a las 5 semanas.

Para evaluar más en profundidad la naturaleza del nuevo tejido formado, se realizan estudios histológicos de las zonas en la que se ha realizado el implante. Después de fijación con tampón neutro de formalina al 10%, las muestras se embeben en parafina, se cortan en láminas de aproximadamente de 4 μm de grosor y se tiñen con tricrómico de Masson (Fig. 5.16). Esta tinción, al igual que otras tinciones tricrómicas, es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente el colágeno de tipo I, que forma fibras gruesas o haces que quedan marcados en color azul (p.e. tejido conjuntivo). Por otro lado, las estructuras oxidadas y el citoplasma celular se tiñen en distintas tonalidades de rojo (p.e. queratina, glóbulos rojos y tejido muscular). Como se puede observar en las figuras 5.16-B y 5.16-C, ambos *scaffolds* siguen presentes en la incisión después de 5 semanas, aunque el *scaffold* con proteína rhBMP-2 (QB) se encuentra significativamente más degradado (Fig.-5.16-C). La tinción tricrómica de Masson permite evidenciar en ambos casos la presencia de células que están expresando colágeno, siendo éstas significativamente más abundantes en los injertos con los *scaffolds* que contienen rhBMP-2.

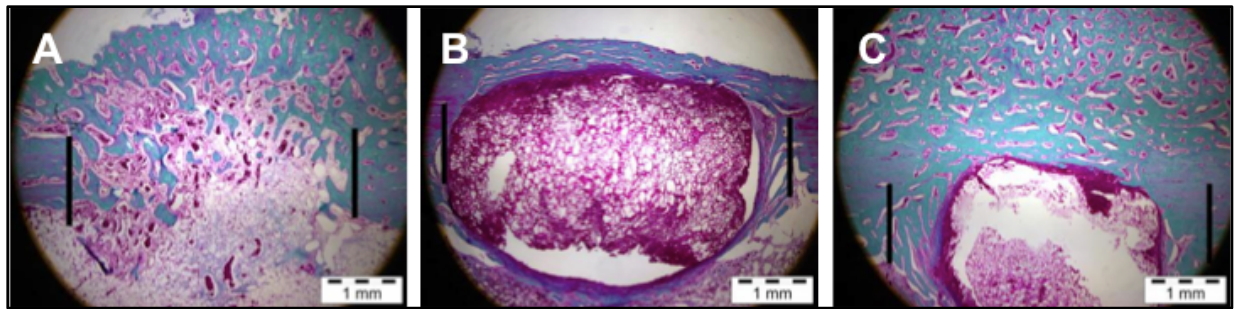


Figura 5.16. Histologías de un detalle de tejido óseo (A) control, (B) en la zona del implante del *scaffold* Q y (C) implante del *scaffold* QB después de 5 semanas de practicado el implante. Las muestras están teñidas con tricrómico de Masson.

5.6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los experimentos mostrados en este capítulo demuestran la posibilidad de emplear la metodología ISISA para la incorporación de la proteína morfogénica ósea rhBMP-2 durante la preparación de *scaffolds* porosos de quitosano (y quitosano dopado con fosfato de calcio). Los ensayos de liberación de rhBMP-2 indican que el proceso de difusión de la proteína es inicialmente rápido y que, tras aproximadamente 3 días, el resto de la proteína confinada en la estructura del *scaffold* (aproximadamente un 70%) pasará a liberarse muy gradualmente a expensas de la degradación del soporte.

Los resultados preliminares *in vitro* e *in vivo* evidencian el mantenimiento de la bioactividad de la proteína rhBMP-2 incorporada en los *scaffolds*, su liberación efectiva desde el *scaffold* al tejido circundante y su capacidad para estimular la actividad ALP en células C2C12 *in vitro* y la formación de nuevo tejido *in vivo* rico en células que expresan colágeno de tipo I. Sin embargo, es necesario profundizar en estos estudios para obtener resultados más concluyentes sobre la capacidad osteoconductora y osteoinductora de estos *scaffolds* y descartar, por ejemplo, un crecimiento tisular descontrolado inducido por la proteína liberada o la formación de tejido conjuntivo en lugar de tejido óseo en la zona del implante.

5.7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ D. Chen, M. Zhao, G.R. Mundy, "Bone morphogenetic proteins" *Growth Factors* 22 (2004) 233-241.
- ² Y.N. Zhao, J. Zhang, X. Wang, B. Chen, Z.F. Xiao, C. Shi, Z. Wei, X. Hou, Q. Wang, J. Dai, "The osteogenic effect of bone morphogenetic protein-2 on the collagen scaffold conjugated with antibodies" *Journal of Controlled Release* 141 (2010) 30-37.
- ³ J.K. Tessmar, A.M. Göpferich, "Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering" *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 274-291.
- ⁴ V. Devescovi, E. Leonardi, G. Ciapetti, E. Cenni, "Growth factors in bone repair" *La Chirurgia degli Organi di Movimento* 92 (2008) 161-168.
- ⁵ M.J. Feito, R.M. Lozano, M. Alcaide, C. Ramírez-Santillén, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.-T. Portolés, "Immobilization and bioactivity evaluation of FGF-1 and FGF-2 on powdered silicon-doped hydroxyapatite and their scaffolds for bone tissue engineering" *Journal of Materials Science:Materials in Medicine* 22 (2011) 405-416.
- ⁶ F.R.A.J. Rose, Q. Hou, R.O.C. Oreffo, "Delivery systems for bone growth factors - The new players in skeletal regeneration" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (2004) 415-427.
- ⁷ M.R. Urist, "Bone: formation by autoinduction" *Science* 150 (1965) 893-899.
- ⁸ T.J. Blokhuis, T. Lindner, "Allograft and bone morphogenetic proteins: an overview" *Injury* 39 (2008) S33-S36.
- ⁹ S.D. Boden, "The ABCs of BMPs" *Orthopaedic nursing/Association of Orthopaedic Nurses* 24 (2005) 49-52.
- ¹⁰ Y. Su, Q. Su, W. Lei, M. Lim, J.R. Venugopal, X. Mo, S. Ramakrishna, S.S. Al-Deyab, M. El-Newehy, "Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering" *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 763-771.
- ¹¹ M. Geiger, R.H. Li, W. Friess, "Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2" *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003) 1613-1629.
- ¹² K. Irie, C. Alpaslan, K. Takahashi, Y. Kondo, N. Izumi, Y. Sakakura, E. Tsuruga, T. Nakajima, S. Ejiri, H. Ozawa, T. Yajima, "Osteoclast differentiation in ectopic bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2)" *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 21 (2003) 363-369.
- ¹³ A.M. Osyczka, M. Damek-Poprawa, A. Wojtowicz, S.O. Akintoye, "Age and skeletal sites affect BMP-2 responsiveness of human bone marrow stromal cells" *Connective Tissue Research* 50 (2009) 270-277.
- ¹⁴ A.M. Henslee, P.P. Spicer, D.M. Yoon, M.B. Nair, V.V. Meretoja, K.E. Witherell, J.A. Jansen, A.G. Mikos, F.K. Kasper, "Biodegradable composite scaffolds incorporating an intramedullary rod and delivering bone morphogenetic protein-2 for stabilization and bone regeneration in segmental long bone defects" *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3627-3637.
- ¹⁵ A.H. Reddi, "Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration" *Nature Biotechnology* 16 (1998) 247-252.
- ¹⁶ N.E. Sharapova, A.P. Kotnova, Z.M. Galushkina, N.V. Lavrora, N.N. Poletaeva, A.E. Tikhvatulin, A.S. Semikhin, A.V. Gromov, L.A. Soboleva, A.E. Ershova, V.V. Zaitsev, O.V. Sergienko, V.G. Lunin, A.S. Karyagina, "Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity in vitro and in vivo" *Cell Molecular Biology* 44 (2010) 923-930.
- ¹⁷ E. Jimi, S. Hirata, K. Osawa, M. Terashita, C. Kitamura, H. Fukushima, "The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects" *International Journal of Dentistry* (2012) n.148261.
- ¹⁸ J.E. Schroeder, R. Mosheiff, "Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence" *Injury* 42 (2011) 609-613.

- ¹⁹ T. Arca, J. Proffitt, P. Genever, "Generating 3D tissue constructs with mesenchymal stem cells and a cancellous bone graft for orthopaedic applications" *Biomedical Materials* 6 (2011) n.025006.
- ²⁰ M.J. Miller, "Osseous tissue engineering in oncological surgery" *Seminars in Surgical Oncology* 19 (2000) 294-301.
- ²¹ A.R. Gazdag, J.M. Lane, D. Glaser, R.A. Forster, "Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications" *Journal of the American Academy Orthopaedic Surgeons* 3 (1995) 1-8.
- ²² P.G. Whang, J.C. Wang, "Bone graft substitutes for spinal fusion" *Spine Journal* 3 (2003) 155-165.
- ²³ P.J. Marie, "Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: An update" *Gene* 498 (2012) 1-4.
- ²⁴ M. Varkey, S.A. Gittens, H. Uludag, "Growth factor delivery for bone tissue repair: an update" *Expert Opinion on Drug Delivery* 1 (2004) 19-36.
- ²⁵ T.M. Fillion, X. Li, A. Mason-Savas, J.M. Kreider, S.A. Goldstein, D.C. Ayers, J. Song, "Elastomeric osteoconductive synthetic scaffolds with required osteoinductivity expedite the repair of critical femoral defects in rats" *Tissue Engineering - Part A* 17 (2011) 503-511.
- ²⁶ R.Z. LeGeros, "Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates" *Clinical Orthopaedic and Related Research* 395 (2002) 81-98.
- ²⁷ H.A. Awad, X. Zhang, D.G. Reynolds, R.E. Guldberg, R.J. O'Keefe, E.M. Schwarz, "Recent advances in gene delivery for structural bone allografts" *Tissue Engineering* 13 (2007) 1973-1985.
- ²⁸ T.P. Richardson, M.C. Peters, A.B. Ennett, D.J. Mooney, "Polymeric system for dual growth factor delivery" *Nature Biotechnology* 19 (2001) 1029-1034.
- ²⁹ K. Lee, E.A. Silva, D.J. Mooney, "growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments" *Journal of the Royal Society Interface* 8 (2011) 153-170.
- ³⁰ K.Y. Lee, S.H. Yuk, "Polymeric protein delivery systems" *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 669-697.
- ³¹ C. Zhang, Y.-Y. Hu, F.-Z. Cui, S.-M. Zhang, D.-K. Ruan, "A study on a tissue-engineered bone using rhBMP-2 induced periosteal cells with a porous nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid) scaffold" *Biomedical Materials* 1 (2006) 56-62.
- ³² M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, "Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications" *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981-1014.
- ³³ W. Wu, J. Shen, P. Banerjee, S. Zhou, "Chitosan-based responsive hybrid nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging and controlled drug delivery" *Biomaterials* 31 (2010) 8371-8381.
- ³⁴ S.-H. Lee, H. Shin, "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering" *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 339-359.
- ³⁵ A. Abarrategi, A. Civantos, V. Ramos, J.V. Sanz Casado, J.L. López-Lacomba, "Chitosan film as rhBMP2 carrier: Delivery properties for bone tissue application" *Biomacromolecules* 9 (2008) 711-718.
- ³⁶ J. San Román, "Polímeros biodegradables para aplicaciones biomédicas - Biomateriales" Ed: R. Sastre, S. de Aza, J. San Román, pp. 219-237.
- ³⁷ A. Chenite, S. Gori, M. Shive, E. Desrosiers, M.D. Buschmann, "Monolithic gelation of chitosan solutions via enzymatic hydrolysis of urea" *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 419-424.
- ³⁸ K.A. Janes, M.J. Alonso, "Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization" *Journal of Applied Polymer Science* 88 (2003) 2769-2776.

- ³⁹ Y. Sun, F. Cui, K. Shi, J. Wang, M. Niu, R. Ma, "The effect of chitosan molecular weight on the characteristics of spray-dried methotrexate-loaded chitosan microspheres for nasal administration" *Drug Development and Industrial Pharmacy* 35 (2009) 379-386.
- ⁴⁰ G. Galed, B. Miralles, I. Paños, A. Santiago, Á. Heras, "N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: influence of the source of chitin" *Carbohydrate Polymers* 62 (2005) 316-320.
- ⁴¹ G. Tishchenko, J. Šimnek, J. Brus, M. netopilfk, M. Pekárek, Z. Walterová, I. Koppová, J. Lenfeld, "Low-molecular-weight chitosans: Preparation and characterization" *Carbohydrate Polymers* 86 (2011) 1077-1081.
- ⁴² F.A.A. Tirkistani, "Thermal analysis of some chitosan Schiff bases" *Polymer Degradation and Stability* 60 (1998) 67-70.
- ⁴³ B.J. Lawrence, E.L. Maase, H.-K. Lin, S.V. Madihally, "Multilayer composite scaffolds with mechanical properties similar to small intestinal submucosa" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 88A (2009) 634-643.
- ⁴⁴ A. Lochmann, H. Nitzsche, S. von Einem, E. Schwarz, K. Mäder, "The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres" *Journal of Controlled Release* 147 (2010) 92-100.
- ⁴⁵ D.S. Keskin, A. Tezcaner, P. Korkusuz, F. Korkusuz, V. Hasirci, "Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair" *Biomaterials* 26 (2005) 4023-4034.
- ⁴⁶ A. Abarrategi, M.C. Gutiérrez, C. Moreno-Vicente, M.J. Hortigüela, V. Ramos, J.L. López-Lacomba, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes" *Biomaterials* 29 (2008) 94-102
- ⁴⁷ T. Katagiri, A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J.M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, T. Suda, "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage" *Journal of Cell Biology* 127 (1994) 1755-1766.
- ⁴⁸ I.S. Kim, Y.M. Song, T.H. Cho, Y.D. Park, K.B. Lee, I. Noh, F. Weber, S.J. Hwang, "In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation" *Development Growth Differentiation* 50 (2008) 553-564.

**VI. ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES
DE SULFATO DE CONDROITINA
Y NANOTUBOS DE CARBONO**

6.1. INTRODUCCIÓN

Descubiertos en los años 90, los nanotubos de carbono (CNTs) han despertado un enorme interés en diversos campos de investigación debido a su gran potencial de desarrollo en diferentes aplicaciones tecnológicas.¹⁻² Tanto los tipos como la estructura de los nanotubos de carbono, han sido descritos en el [apartado 3.1.1.1](#) de esta memoria.³ Aunque las propiedades de los CNTs son muy dependientes de su estructura, y ésta está a su vez condicionada por el proceso de síntesis, se puede afirmar que éstas son, en general, y para todos sus tipos, extraordinarias.⁴

Así dada su gran área superficial presentan un gran potencial en la adsorción de diversas sustancias químicas. Con respecto a sus propiedades eléctricas, los CNTs muestran un amplio margen de conductividades, en función de su diámetro, quiralidad y el número de capas de su composición, con valores de entre 10^2 - 10^6 S/cm de conductividad eléctrica y de entre 2000 -6000 W/(m·K) de conductividad térmica.⁵⁻⁶ Estos altos valores de conductividad, les confieren enorme potencial en el campo de la electroquímica, con el desarrollo de supercondensadores, dispositivos de almacenamiento de hidrógeno, pilas de combustible o fabricación de células solares. En el campo de la nanoelectrónica también han sido estudiados para fabricar numerosos dispositivos, desde sensores o transistores, hasta memorias infomáticas, dispositivos de emisión de campo u optoelectrónicos. Si las propiedades eléctricas son sorprendentes, las propiedades mecánicas pueden llegar a serlo aún más. Así, se ha encontrado que pueden alcanzar valores de módulo de Young de 1.26 TPa (6 veces más que el acero de alta tensión), o una resistencia a la tensión de 50-200 GPa, lo cual les califica entre los materiales más resistentes descubiertos.⁷⁻⁸

Otra propiedad interesante de los CNTs, relacionada con el trabajo de esta memoria, es su biocompatibilidad, aunque este tema se discutirá en detalle en el próximo capítulo. Esta propiedad les ha permitido irrumpir también en el campo de la medicina y la biotecnología.⁹

6.1.1. SOPORTES DE CNTs

Las sobresalientes propiedades físicas de estas nanoestructuras, hicieron pensar que, con la adición de nanotubos de carbono a matrices poliméricas, se obtendrían materiales con una mayor resistencia a la tensión y fractura, además de impartirles propiedades térmicas y conductoras. En 1994, se preparó el primer material nanocompuesto de polímero con nanotubos de carbono, hecho que marcó el inicio de la preparación de estos materiales

empleando diversas matrices poliméricas.¹⁰ Desde entonces, se ha intentado transferir las propiedades físicas de estos materiales nanoestructurados a la matriz polimérica.

Para poder desarrollar el gran potencial de los CNTs en nuevas y prometedoras aplicaciones, es necesario realizar el ensamblado de los nanotubos en estructuras organizadas, tanto en dispositivos moleculares o a nano-escala, como en forma de *composites*.¹¹ Sin embargo, la construcción de arquitecturas organizadas de CNTs continúa siendo un cometido difícil de conseguir. Los métodos descritos para generar estructuras jerárquicas de CNTs pueden agruparse en dos: el ensamblado de CNTs durante y después de su síntesis.¹²⁻¹³ Entre los ensamblados de CNTs preparados después de la síntesis, se encuentran preparaciones de láminas, fibras, bloques y estructuras porosas. En los primeros trabajos publicados sobre estructuras porosas de CNTs de tipo 3D, la tercera dimensión sólo alcanzaba la longitud de un nanotubo.¹⁴⁻¹⁵ Tras la publicación de estos trabajos pioneros se prepararon espumas de poliestireno y CNTs,¹⁶ espumas ultraligeras de poliuretano,¹⁷ esponjas de SWCNTs y gelatina,¹⁸ aerogeles reforzados con PVA,¹⁹ *composites* de quitosano y MWCNTs,²⁰ entre otros. En general, el desarrollo de nuevas técnicas ha guiado el avance en la preparación de estructuras de nanotubos ensamblados, permitiendo la manipulación de éstos en diferentes escalas (desde la nano hasta la macro) para la síntesis de dispositivos.

Uno de los requisitos más importantes para obtener materiales compuestos con buenas propiedades es conseguir una dispersión homogénea de los CNTs lo cual incrementa la interacción interfacial con la matriz. Sin embargo, los nanotubos de carbono se presentan en forma de grandes aglomerados con tamaños del orden de varias micras, donde las fuertes interacciones de van der Waals entre los CNTs hacen compleja su completa dispersión, lo cual ha representado la mayor limitación en la preparación exitosa de estos materiales.

Con el fin de alcanzar un alto grado de dispersión, que mejore la homogeneidad de los nanocomposites finales, los CNTs son generalmente dispersados aplicando ondas de ultrasonidos, y en numerosos casos, son además modificados a nivel superficial por ejemplo, mediante funcionalización, covalente y no covalente, con moléculas afines a la matriz polimérica.

6.1.2. SOPORTES 3D DE CNTs MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA

El método más común para dispersar los nanotubos de carbono consiste en suspenderlos en una disolución que contenga un agente dispersante (por ejemplo, un polímero). El papel del polímero en la construcción de los soportes monolíticos pasa primero por ser el agente

dispersante de los CNTs en las diversas suspensiones acuosas, y posteriormente, a formar parte de los *scaffolds* como el “cemento” que mantiene unidas las arquitecturas 3D de CNTs.

En este capítulo se describe la construcción de estructuras 3D porosas con un alto porcentaje en CNTs mediante un procedimiento de autoensamblado inducido por segregación de hielo (ISISA). El control de las variables que afectan a la metodología ISISA permite controlar, en cierta medida, la morfología y las propiedades de los *scaffolds*. De esta forma, se puede optimizar el proceso criogénico para obtener las estructuras con las características más adecuadas para cada aplicación. Para llevar a cabo el estudio, se emplea sulfato de condroitina como agente dispersante²¹ y dos tipos de nanotubos de carbono multipared, de distintas longitudes, obtenidos mediante tratamientos con ácidos (MWCNTs y NHTS).

6.2. TRATAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CNTs

Para eliminar las trazas de metales procedentes de su síntesis, todos los MWCNTs empleados se purifican previamente, mediante tratamiento en ácido nítrico concentrado, ([ver apartado 3.2.2.1](#)). Este proceso de purificación permite limpiar los MWCNTs de impurezas (trazas de carbón amorfo y metales) que contienen debido a su proceso de síntesis. Además, este proceso favorece un aumento de la estabilidad temporal de las suspensiones en etanol de los MWCNTs favoreciendo su dispersión, por la formación de grupos carboxílicos en su superficie ([Fig. 6.1](#)).²² Los nanotubos así tratados presentan menor interacción entre sí y una mayor afinidad por el disolvente. En la [figura 6.1](#) se observa que después de tres horas de reposo a temperatura ambiente, los nanotubos sin modificar comienzan a precipitar por carecer de grupos polares, mostrando una mayor facilidad en la formación de aglomeraciones con respecto a los nanotubos purificados.

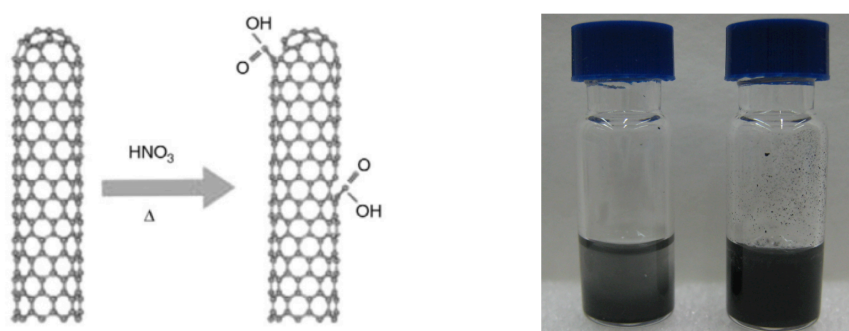


Figura 6.1. Esquema de la funcionalización de los nanotubos mediante ácido nítrico (izquierda). Ensayo de sedimentación en etanol de MWCNTs tratados con ácido nítrico concentrado (frasco a la derecha) y sin tratar (frasco a la izquierda).

También se lleva a cabo un segundo tratamiento de oxidación sobre los nanotubos purificados para obtener CNTs más cortos que en esta memoria serán nombrados como NHTS (N). En la literatura se describen diversos métodos para la oxidación de nanotubos de carbono. En concreto, el uso de medios oxidantes fuertes y tiempos de reacción prolongados, produce una destrucción parcial de las paredes de los nanotubos disminuyendo su longitud considerablemente.²³⁻²⁴ Uno de los agentes oxidantes más utilizados es el ácido nítrico, el cual permite obtener mayoritariamente grupos ácido carboxílico en la superficie de los nanotubos de carbono. La aplicación de métodos físicos, como ondas de ultrasonidos, también es empleada como estrategia para lograr la dispersión de los nanotubos en medio líquido. Además, los efectos de la aplicación de estas ondas en la estructura de los nanotubos de carbono, pueden ser muy similares a los efectos de la funcionalización covalente, dado que durante la cavitación acústica, la velocidad de impacto de los microchorros como producto de la implosión de la burbuja, rompe los enlaces de la estructura del nanotubo, creando grandes áreas con defectos estructurales.²⁵ Así que, si el tiempo de exposición a las ondas de ultrasonido es muy prolongado, ocurre una ruptura por desestabilización de la conjugación de los enlaces π sobre superficie del nanotubo, y se obtiene una reducción de la relación de aspecto longitud/diámetro. Obviamente, además de acortar la longitud de los CNTs, se produce un cambio en las propiedades intrínsecas del nanotubos de carbono, como las propiedades eléctricas y térmicas.

En este trabajo, los nanotubos de carbono purificados son además funcionalizados en ocasiones (para obtener NHTS) mediante un protocolo ya descrito en literatura, empleando una mezcla 3:1 de, respectivamente, ácido sulfúrico y ácido nítrico durante 4 horas en baño de ultrasonidos ([ver apartado 3.2.2.1.2](#)).²⁶

Mediante las micrografías electrónicas de transmisión es posible ver la morfología de los nanotubos dispersados en etanol ([Fig. 6.2](#)). Se observa que los nanotubos sin tratar tienden a formar más aglomerados y presentan impurezas con respecto a los purificados con ácido nítrico. Por otro lado, los nanotubos tratados con nítrico y sulfúrico en baño de ultrasonidos (NHTS) aparecen más cortos.

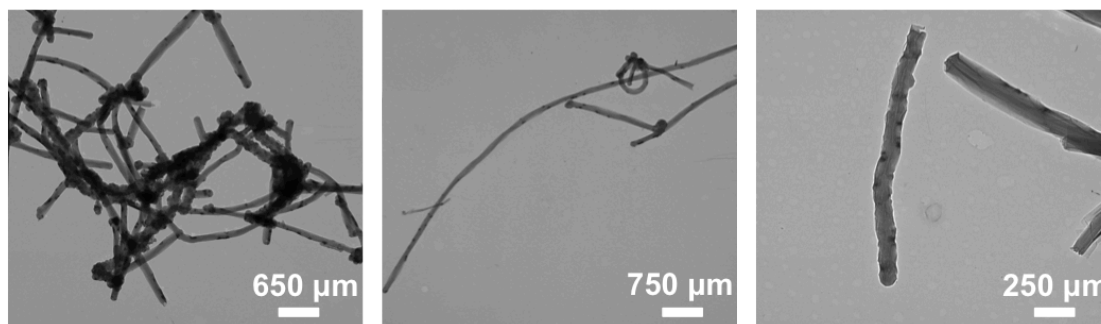


Figura 6.2. Micrografías de TEM de nanotubos MWCNTs sin purificar (izquierda) y purificados (centro) y nanotubos NHTS (derecha).

La aparición de defectos en la superficie de los nanotubos de carbono, debida a la oxidación, afecta a su estabilidad térmica.²⁷⁻²⁸ Así la gran estabilidad térmica que muestran los CNTs tiende a disminuir a medida que aumenta el grado de modificación de los mismos, dado que aumenta el número de sitios defectuosos, y por tanto, se generan estructuras menos estables, que en condiciones de calentamiento extremo, se convierten en compuestos volátiles.

En la [figura 6.3](#) se observan los termogramas correspondientes al análisis termogravimétrico de muestras de nanotubos MWCNTs, purificados y sin purificar, y NHTS. En el caso de los nanotubos MWCNTs sin purificar se observa una pérdida inicial de peso debida a la eliminación de las impurezas, que no se ve en los nanotubos purificados. En el caso de los nanotubos NHTS, la temperatura a la cual comienza la primera pérdida de peso puede corresponder a la pérdida de agua absorbida por su carácter hidrofílico, debido a presencia de grupos polares en su estructura. Además, como se ha mencionado anteriormente, la oxidación de los nanotubos de carbono genera defectos en la superficie que, al ser calentados, comienzan a migrar formando compuestos volátiles. De acuerdo con el análisis TGA realizado, la concentración relativa de defectos en los nanotubos de carbono NHTS es cercano al 6% p/p.

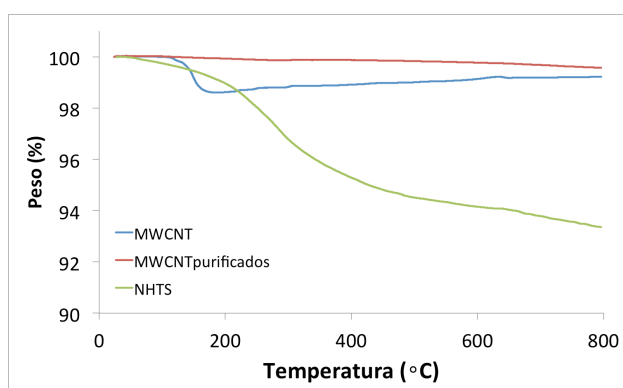


Figura 6.3. Análisis termogravimétrico (TGA) de nanotubos de carbono MWCNTs y NHTS.

6.3. PREPARACIÓN DE LOS *SCAFFOLDS* DE CNTs MEDIANTE ISISA

Con el fin de dispersar homogéneamente los nanotubos de carbono (MWCNTs y NHTS) se utilizan una serie de disoluciones acuosas de sulfato de condroitina en concentraciones bajas (1-6% p/p). Las mezclas permanecen en agitación durante 24 horas. La dispersión final de los nanotubos de carbono en el disolvente se lleva a cabo aplicando ondas de ultrasonido (5 minutos), en el que los altos esfuerzos de corte generados durante la cavitación acústica, fragmentan los aglomerados de nanotubos de carbono, pero sin modificar los nanotubos. Estas suspensiones se recogen en jeringuillas de insulina y se congelan por inmersión a velocidad constante en un baño de nitrógeno líquido (ver apartado 3.2.2.3.2). Tras el liofilizado de las muestras se obtienen monolitos constituidos en su mayor parte por CNTs que conservan la forma cilíndrica de las jeringuillas en que se preparan (Fig. 6.4). Como se menciona en el apartado 3.2.2.5 se descartan las partes densa y celular de los *scaffolds* eliminando los ≈ 2 centímetros de *scaffold* que se corresponden con las primeras partes en contacto con el líquido criogénico.

La morfología de estos monolitos 3D se estudia mediante microscopía SEM. En los *scaffolds* se observa un patrón regular de poros reconocible a lo largo de toda su estructura interna. En todos los casos, los monolitos muestran una estructura macroporosa de nanotubos interconectados (*scaffolds*), pero la homogeneidad y el grado de ordenamiento de estas estructuras varían según las variables que afectan a la metodología ISISA.

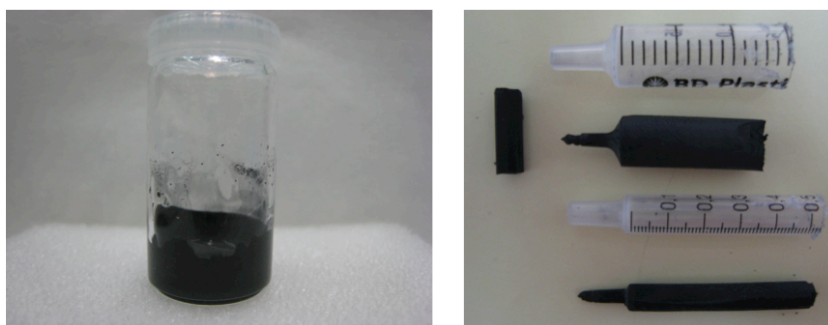


Figura 6.4. Fotografía de dispersión de nanotubos (MWCNTs) en disolución acuosa de sulfato de condroitina (izquierda) y *scaffolds* preparados por metodología ISISA (derecha).

6.3.1. LA VELOCIDAD DE CONGELADO

Dado que la velocidad de congelado durante el proceso criogénico es uno de los parámetros fundamentales para alterar la microestructura y las propiedades de los *scaffolds*, en este apartado se realiza un análisis de la morfología de los soportes obtenidos a partir de

disoluciones acuosas con igual contenido de polímero y nanotubos de carbono pero congeladas empleando diferentes velocidades de inmersión en un baño de nitrógeno líquido.

En las [figuras 6.5](#) y [6.6](#) se muestran una serie de micrografías de SEM de secciones perpendiculares a la dirección de congelado de monolitos preparados a partir de suspensiones con idénticas cantidades de CNTs y de sulfato de condroitina (CS1W6 y CS1N6) en función de la velocidad de congelado.

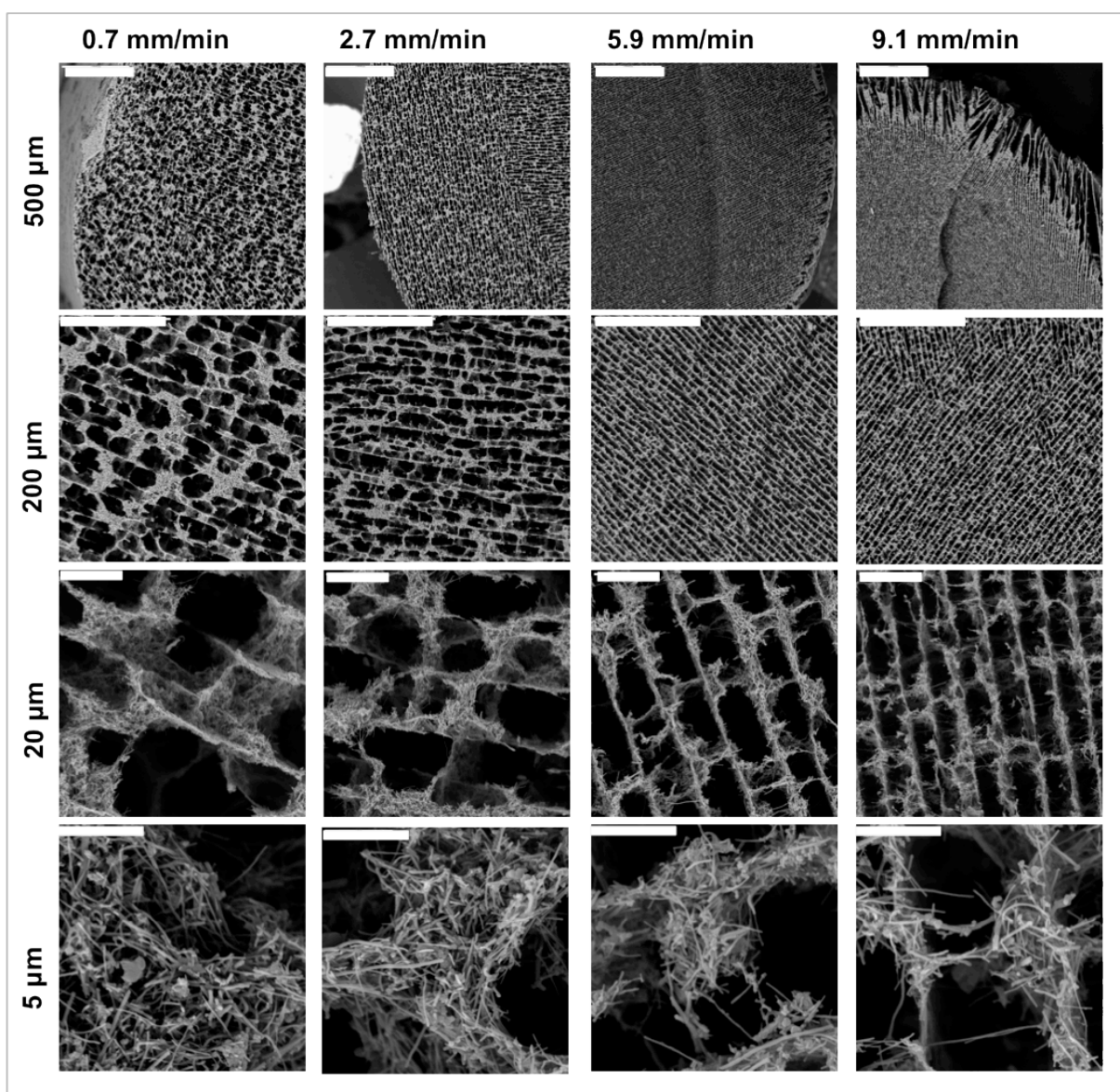


Figura 6.5. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de algunos *scaffolds* preparados a partir de suspensiones al 1% p/p de sulfato de condroitina y al 6% p/p de nanotubos de carbono MWCNTs (CS1W6) a distintas velocidades de inmersión (0.7, 2.7, 5.9 y 9.1 mm/min).

En estas micrografías se puede apreciar cómo al ir aumentando la velocidad de inmersión, y con ello la velocidad de congelado, va disminuyendo progresivamente el grosor de las paredes que sostienen la estructura 3D, a la par que el tamaño de los microcanales. De acuerdo con los resultados descritos en literatura, las velocidades de congelado lentas permiten la formación de cristales de hielo más grandes, que sirven como molde para obtener una estructura de canales grandes. Por otro lado, las velocidades de procesamiento rápidas favorecen el subenfriamiento del agua que contiene la muestra impidiendo la formación de cristales de hielo grandes, dando origen a la formación de una estructura de microcanales más pequeños.²⁹⁻³⁰

Se observa que los *scaffolds* preparados a velocidades de procesamiento más rápidas (a 5.9 mm/min o mayores) pueden presentar una heterogeneidad radial en las proximidades al borde del monolito. La baja capacidad calorífica y la baja conductividad térmica del nitrógeno líquido hacen que, alrededor de la muestra que se congela se forme una capa de vapor de nitrógeno, que actúa como efecto barrera (*Leidenfrost effect*), provocando la formación de cristales de hielo más grandes en la parte exterior de la muestra que en la parte interior.

Comparando las micrografías de las [figuras 6.5](#) y [6.6](#) se observa como el uso de los nanotubos NHTS en la preparación de los *scaffolds* provoca un cambio en el aspecto de la estructura. En este caso, la presencia de nanotubos de carbono más cortos promueve una mayor capacidad para formar cristales de hielo, de mayor tamaño, generando un tamaño de poro más grande y una mayor acumulación de materia entre los canales.

La regularidad del patrón de cavidades parece aumentar con la velocidad de inmersión hasta llegar a una velocidad de 5.9 mm/min. En cambio, la estructura interna del *scaffold* congelado a mayor velocidad (9.1 mm/min) empieza a mostrar defectos en su organización como consecuencia de un segregado más rápido y irregular.

Es preciso destacar que el *scaffold* con NHTS preparado a velocidad de procesamiento más lenta (0.7 mm/min) no presenta una estructura ordenada de canales, debido a la formación de cristales de hielo demasiado grandes que son más difíciles de organizarse.

La posibilidad de obtener monolitos con canales ordenados y homogéneos, hace que la mayoría de los *scaffolds* descritos a continuación se preparen a velocidad de procesamiento de 5.9 mm/min. En caso contrario, se especificarán las condiciones particulares de preparación.

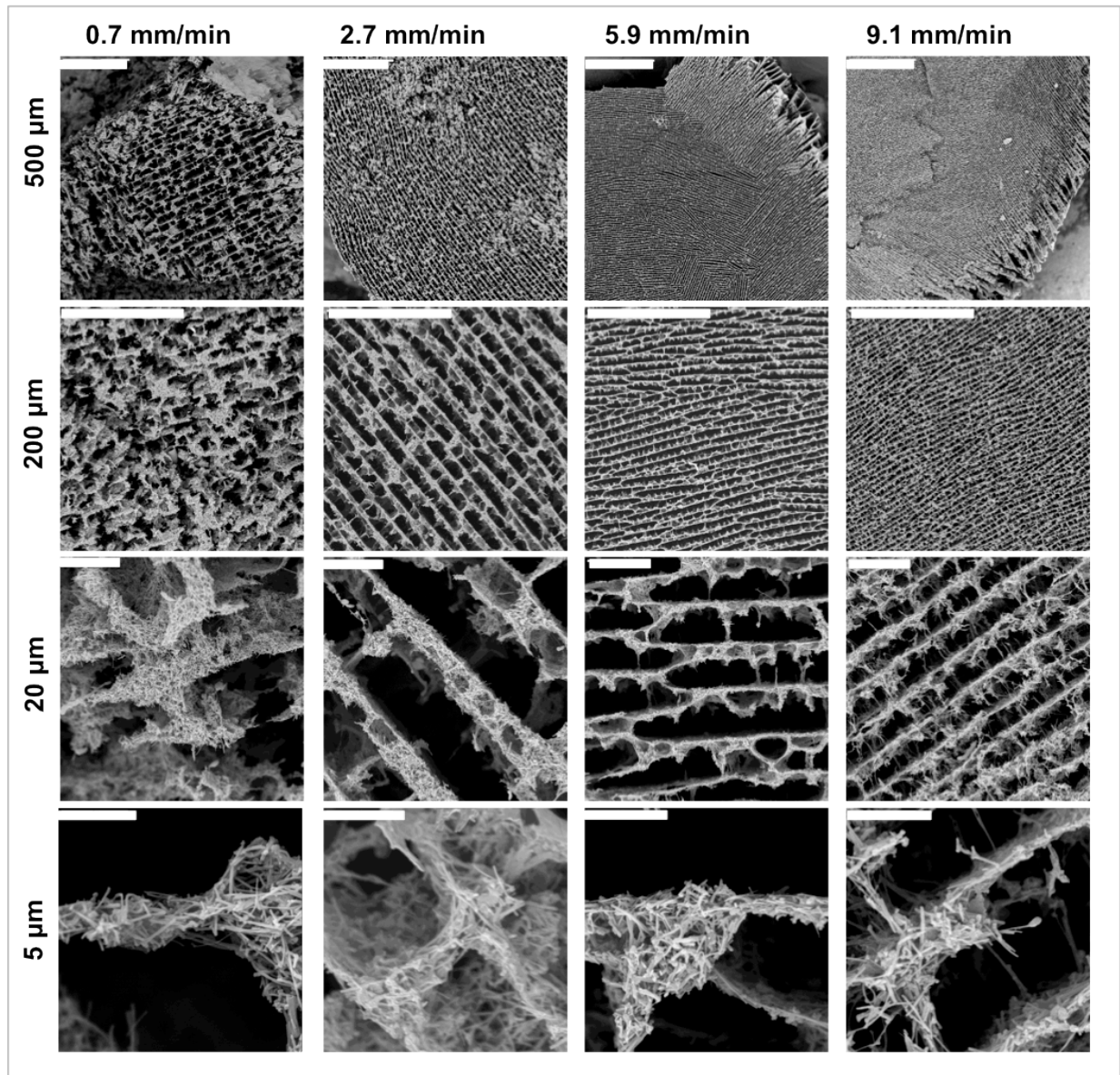


Figura 6.6. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de algunos *scaffolds* preparados a partir de suspensiones al 1% p/p de sulfato de condroitina y al 6% p/p de nanotubos de carbono NHTS (CS1N6) a distintas velocidades de inmersión (0.7, 2.7, 5.9 y 9.1 mm/min).

6.3.2. LA CONCENTRACIÓN DE SOLUTO Y DE CNTs

Como se mencionó en la introducción, la porosidad final de un criogel está directamente relacionada con el volumen de agua presente en la mezcla original. Las [figuras 6.7, 6.8 y 6.9](#) muestran una serie de micrografías de SEM de *scaffolds* con distintos contenidos en sulfato de

condroitina y nanotubos de carbono, preparados con MWCNTs (Fig. 6.7 y 6.8) y con NHTS (Fig. 6.9).

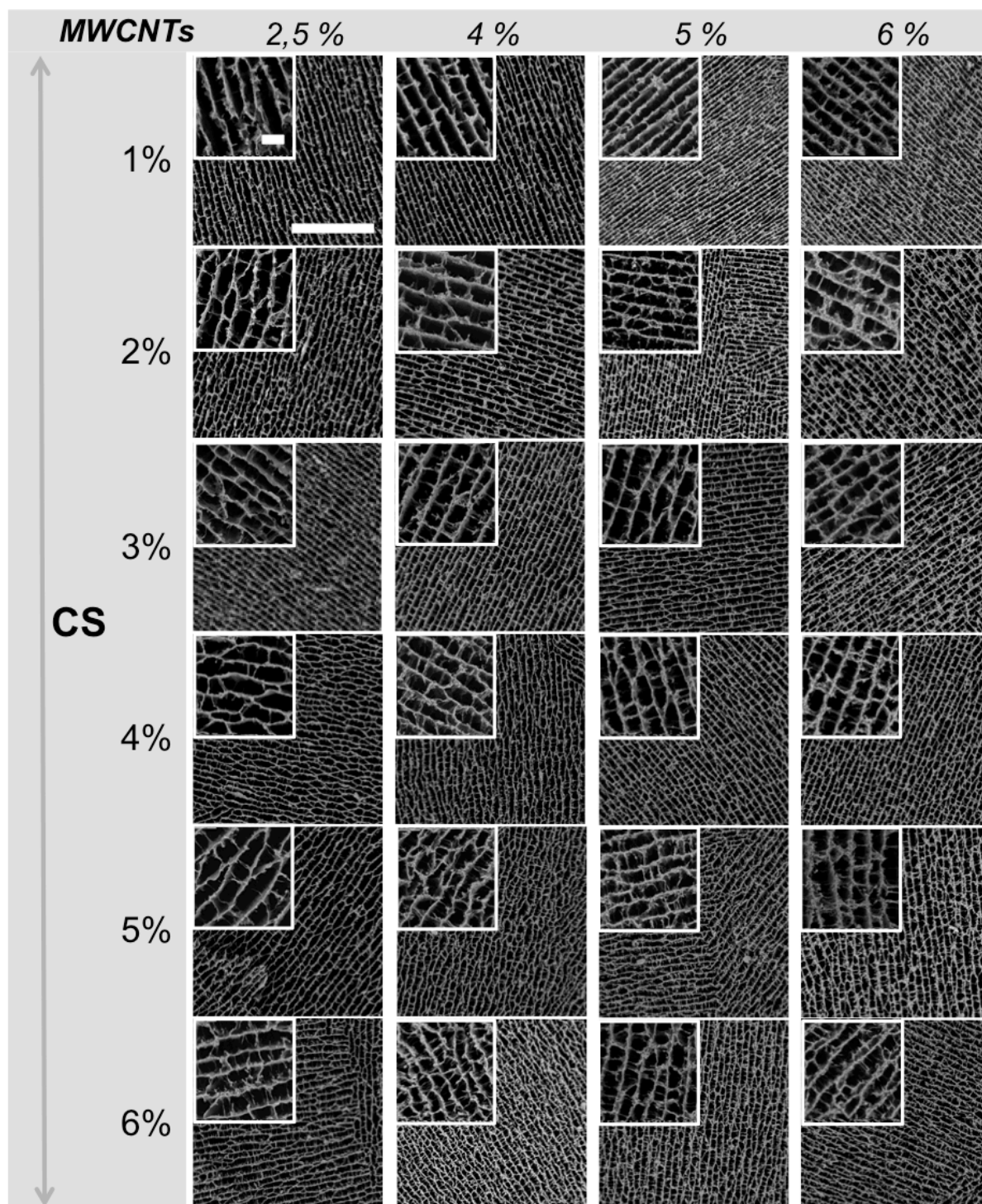


Figura 6.7. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de CS/MWCNTs congelados a 5.9 mm/min y conteniendo distintos porcentajes (p/p) de MWCNTs y sulfato de condroitina. Barras de escala de 200 μm (micrografías grandes) y 20 μm (micrografías pequeñas).

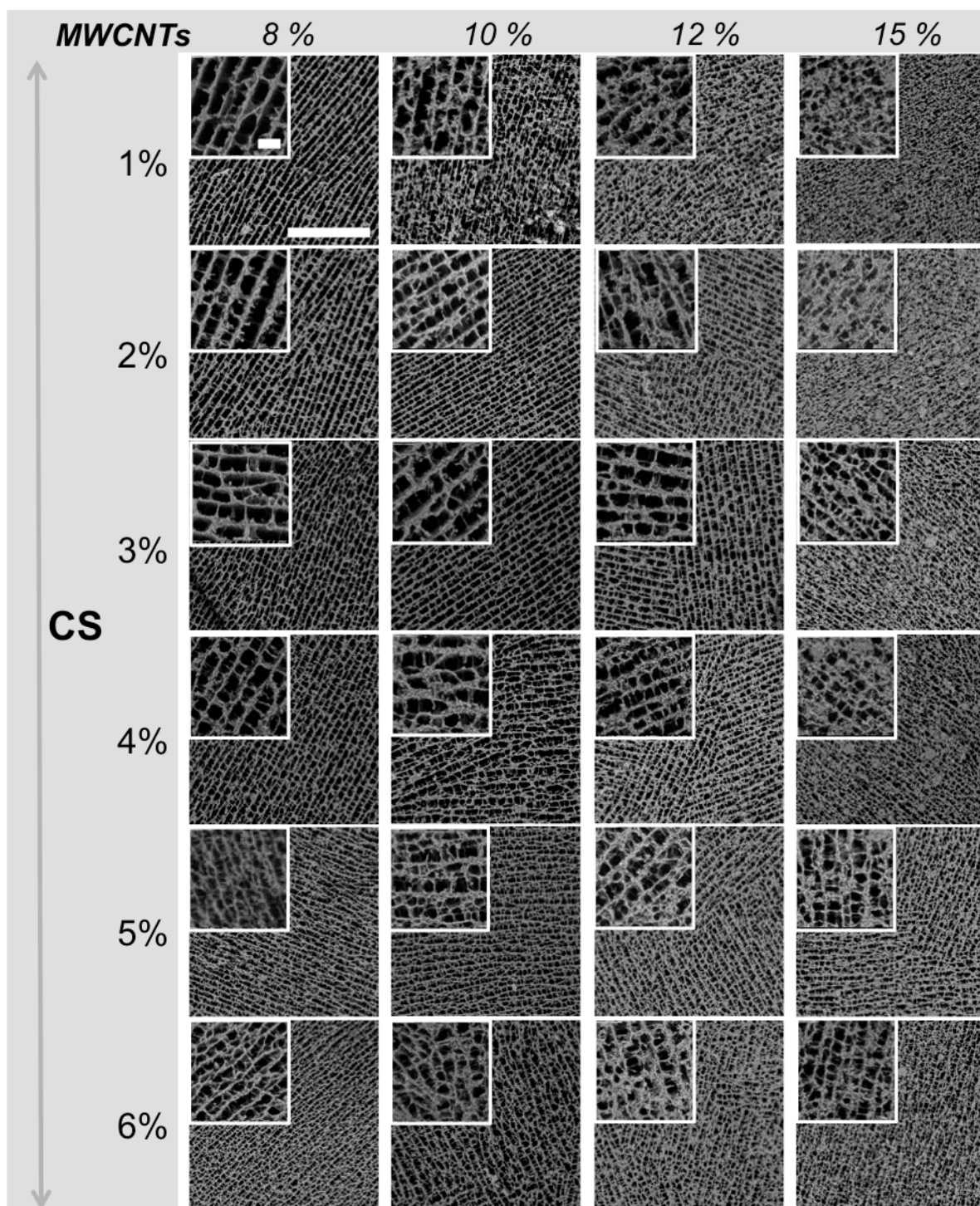


Figura 6.8. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de CS/MWCNTs congelados a 5.9 mm/min y conteniendo distintos porcentajes (p/p) de MWCNTs y sulfato de condroitina. Barras de escala de 200 μm (micrografías grandes) y 20 μm (micrografías pequeñas).

Estructuras tridimensionales de sulfato de condroitina y nanotubos de carbono

Comparando las micrografías se detecta cómo a medida que se incrementa el porcentaje en CNTs en la suspensión de partida aumenta el grosor de las paredes que sostienen la estructura. Ésta es una consecuencia lógica del aumento de materia en los *scaffolds*. Dependiendo de la concentración empleada, la alta dispersión de los nanotubos aumenta considerablemente la viscosidad de la suspensión, debido a un incremento en la interacción superficial entre los nanotubos y el medio. Este fenómeno no permite aumentar en modo indefinido el porcentaje de CNTs en la disolución inicial. En general, incrementando el contenido de CNTs se obtienen estructuras en las cuales los poros están casi cerrados, es decir, el contenido de nanotubos alcanza valores que favorecen la formación de hielo amorfo, más que de hielo cristalino y, en consecuencia, la segregación de materia casi no tiene lugar.³¹

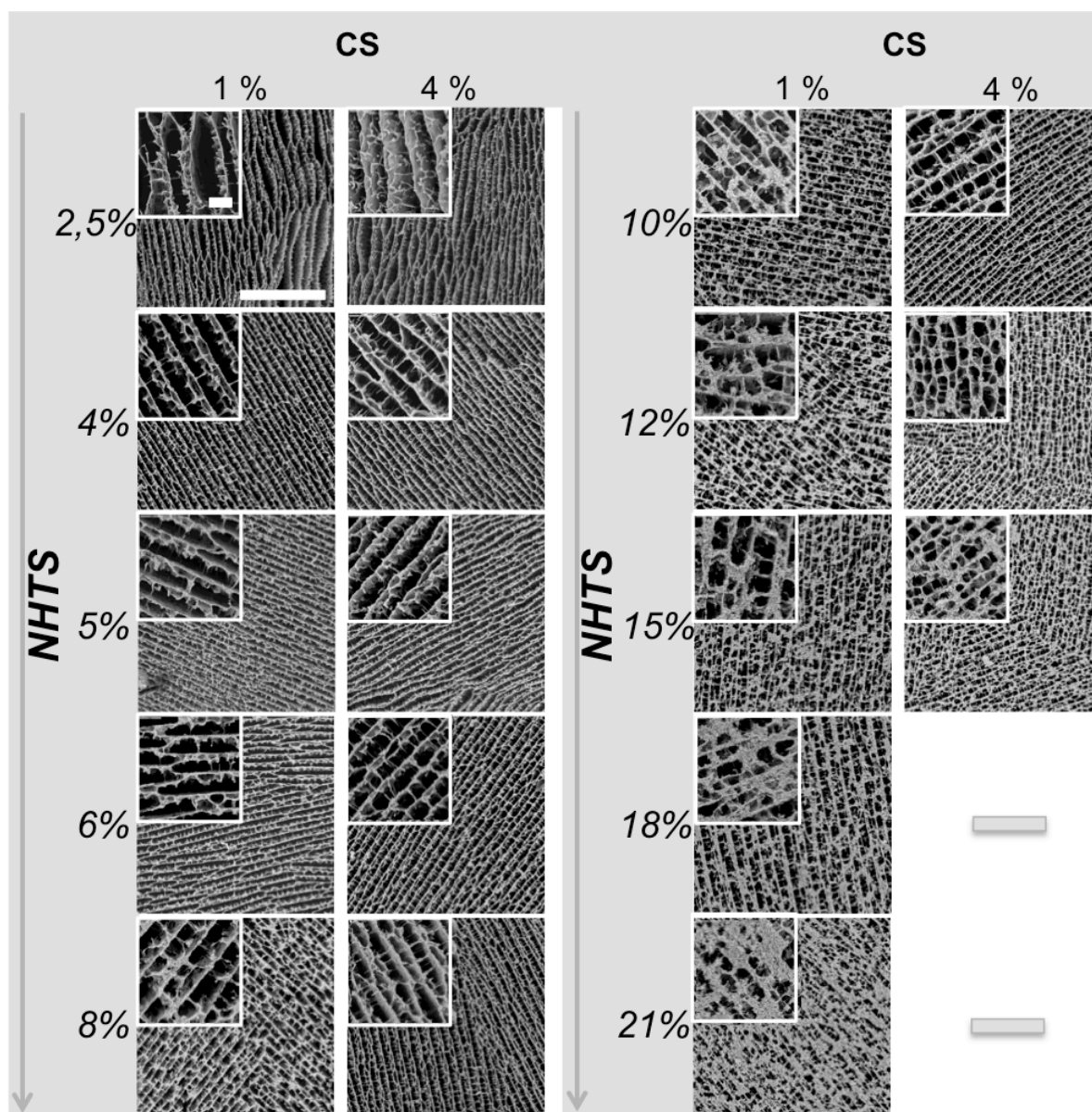


Figura 6.9. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de CS/NHTS congelados a 5.9 mm/min y conteniendo distintos porcentajes (p/p) de NHTS y sulfato de condroitina. Barras de escala de 200 μm (micrografías grandes) y 20 μm (micrografías pequeñas).

Observando las micrografías de la [figura 6.9](#), de *scaffolds* con NHTS, destacan dos diferencias evidentes con respecto a los *scaffolds* preparados con MWCNTs. En primer lugar, para los soportes con CS1% (p/p) y baja concentración de NHTS (hasta aprox. el 6% p/p) se observa la formación de una arquitectura laminar paralela, con una interconexión baja de CS entre las distintas capas laminares. Este efecto es minimizado con el incremento del contenido de CS, que favorece la formación de pilares entrecruzados entre las distintas capas.

En segundo lugar, la presencia de nanotubos cortos (NHTS) permite preparar dispersiones con más cantidad de nanotubos (hasta aprox. el 21% p/p) con respecto a las dispersiones de MWCNTs. Esto se debe a la menor viscosidad de las dispersiones de NHTS que posibilitan la obtención de una dispersión homogénea con una mínima cantidad de sulfato de condroitina (1% p/p). En general, el aumento del contenido de CS favorece la formación de pilares entrecruzados entre las distintas capas dando lugar a una estructura más interconectada. Además, el tamaño de los canales de los poros disminuye al aumentar la concentración de CS como consecuencia de la mayor dificultad para formar cristales de hielo.

Independientemente de estas diferencias, todos los soportes preparados, con MWCNTs y NHTS, presentan estructuras ordenadas con un diseño regular de láminas paralelas con puentes cruzándose entre ellas (vista frontal de secciones trasversales). Hay que destacar que esta característica no es extrapolable a otros tipos de CNTs en sulfato de condroitina. Por ejemplo, un estudio morfológico de *scaffolds* preparados con mezclas de nanotubos de pared simple (SWCNTs) ([ver apartado 3.1.1.1](#)) muestra que el aumento de la cantidad de SWCNTs en las dispersiones determina la formación de estructuras menos ordenadas ([Fig. 6.10](#)). En este caso, la mayor flexibilidad y relación de aspecto de los SWCNTs usados para este estudio ([ver apartado 3.1.1.1](#)), dificulta su ordenamiento durante el proceso de segregación (de igual manera que un polímero de alto peso molecular) dando lugar a las estructuras desordenadas.

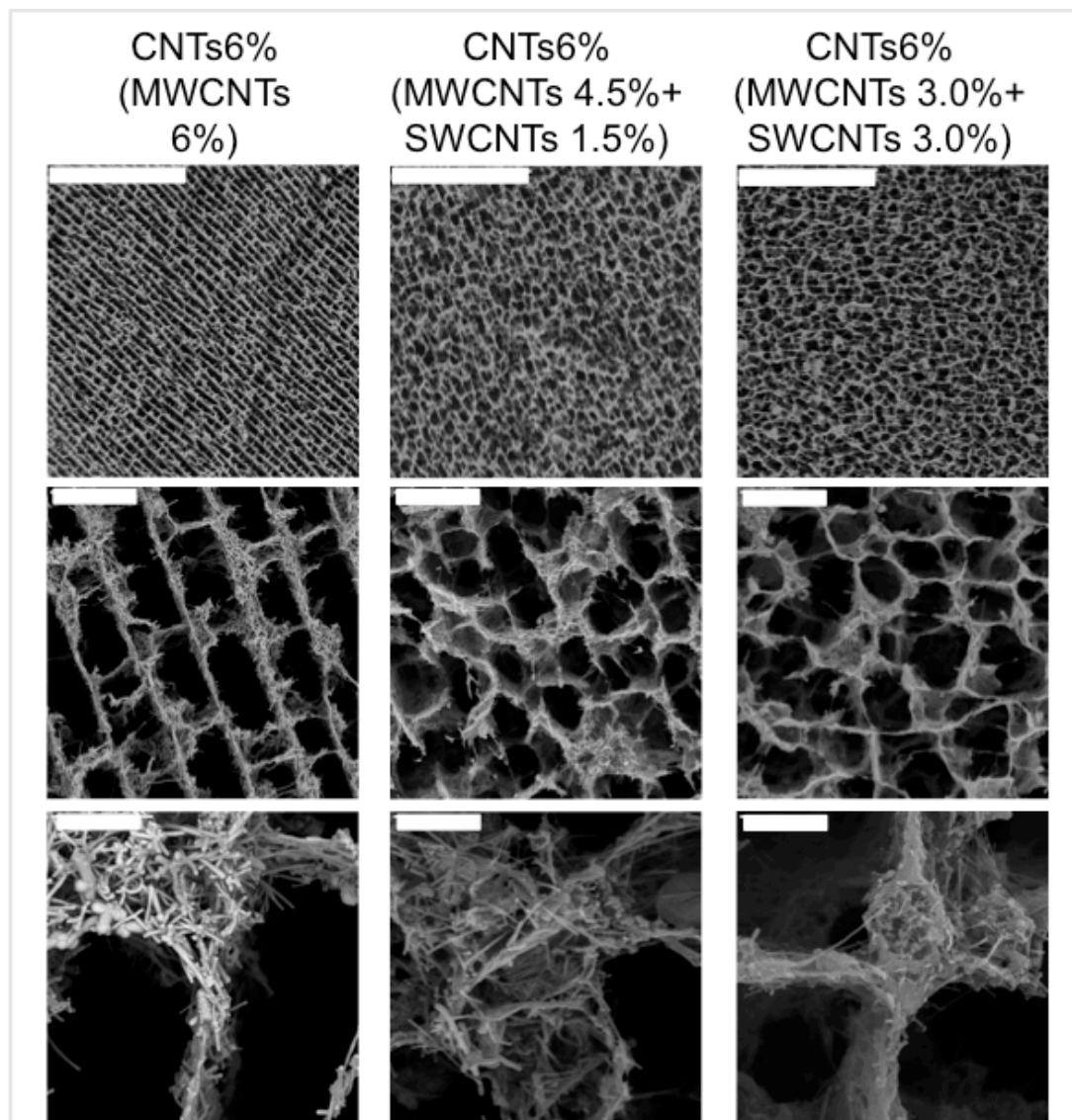


Figura 6.10. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de CS/MWCNTs y CS/MWCNTs-SWCNTs congelados a 5.9 mm/min. Barras de escala, respectivamente, de 200 (arriba), 20 (centro) y 5 μm (abajo).

6.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS *SCAFFOLDS* DE CNTs

Las propiedades de estos materiales, como las propiedades mecánicas, o la conductividad, varían de acuerdo con la morfología obtenida. En este apartado, se realiza una caracterización de las propiedades de los *scaffolds* preparados empleando sulfato de condroitina como agente dispersante y los dos tipos de nanotubos de carbono (NHTS y MWCNTs), con y sin entrecruzar con HMDI.

6.4.1. ENTRECruzAMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE LOS SCAFFOLDS

La solubilidad del sulfato de condroitina (CS) en agua, hizo necesario el uso de un agente entrecruzante, para que el *scaffold* no se desmoronase cuando entrara en contacto con la misma. El agente entrecruzante seleccionado fue HMDI (1,6-hexametilendiisocianato).³² Este compuesto permite entrecruzar las cadenas de polímero formando un puente, principalmente, entre los grupos carboxilos del sulfato de condroitina (Fig. 6.11). De todas formas, la presencia de los mismos grupos químicos en los nanotubos de carbono funcionalizados (tanto los MWCNTs como los NHTS) hace posible que también se produzca la formación de enlaces covalentes con los nanotubos.³³ La reacción de entrecruzamiento se lleva a cabo mediante exposición de los *scaffolds* a vapores de HMDI, a 37 °C durante una semana (ver apartado 3.2.2.3.3).

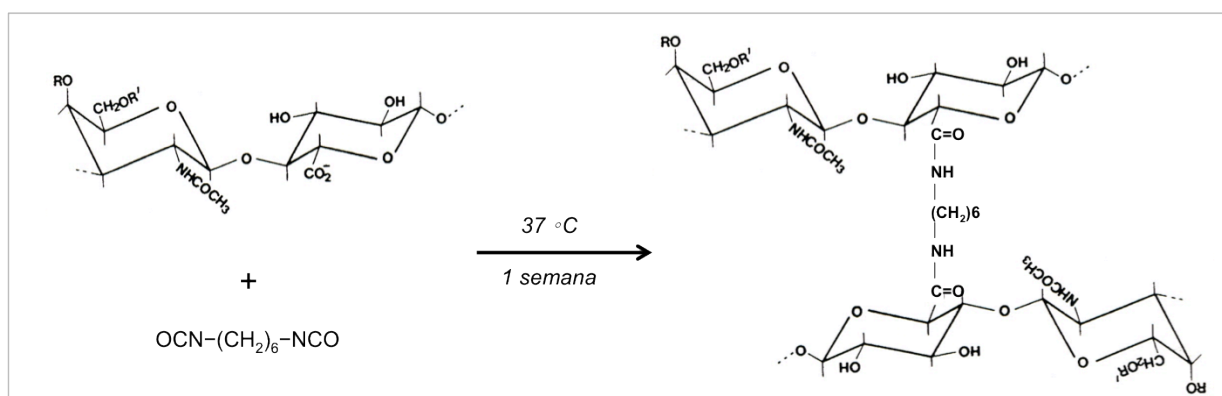


Figura 6.11. Reacción de entrecruzamiento de las cadenas de sulfato de condroitina con HMDI.

En la figura 6.12 se comparan los termogramas obtenidos para el soporte CS1W10 y el correspondiente entrecruzado con HMDI (CS1W10H). El gráfico muestra el porcentaje de pérdida de peso en relación con la variación de temperatura. Se observa que la introducción del agente entrecruzante afecta la estabilidad térmica del *scaffold*, debido a que disminuye el valor de temperatura de máxima velocidad de descomposición (de 234 °C a 230 °C) y el porcentaje de la pérdida de peso con respecto del *scaffold* sin entrecruzar. Esta variación es mínima, pero indica que la molécula de entrecruzante afecta la estabilidad térmica del sulfato de condroitina, por la formación de enlaces con las cadenas poliméricas.³⁴ Además, el mayor porcentaje de pérdida de peso ($\approx 2\%$) para el *scaffold* entrecruzado da una idea del porcentaje de agente entrecruzante incorporado en la matriz.

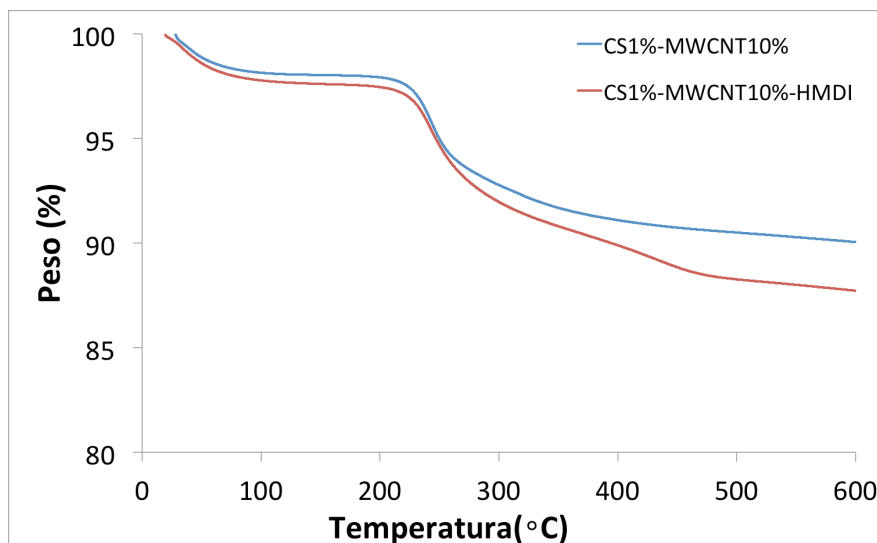


Figura 6.12. Termogramas (TGA) de muestras de *scaffolds* de CS1W10, sin entrecruzar (curva azul), y CS1W10H, entrecruzado con HMDI (curva roja).

6.4.2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HINCHAMIENTO

La primera gran diferencia que presentan las matrices entrecruzadas, en comparación con las no entrecruzadas, es que no se disuelve el sulfato de condroitina que soporta la estructura (Fig. 6.13). Además, el entrecruzamiento es uno de los factores más importantes que afectan al hinchamiento de los *scaffolds*, de manera que matrices muy entrecruzadas tienen una estructura más compacta y se hinchan menos.

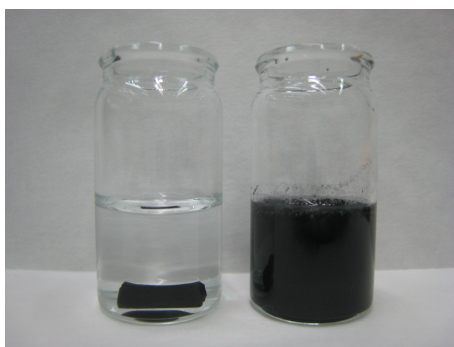


Figura 6.13. Fotografía de un *scaffold* de CS con MWCNT entrecruzado (izquierda) y no entrecruzado (derecha).

En los estudios de hinchamiento de las matrices, la entrada de líquido en el interior del *scaffold* alcanza un límite o grado máximo de hinchamiento, ya que la estructura covalente no

puede deformarse indefinitivamente. El estudio del grado de hinchamiento se efectúa en tampón PBS 0.1M y pH=7.4 (ver apartado 3.2.1.5.4).

En la [tabla 6.1](#) se muestran las pequeñas diferencias en los valores del grado de hinchamiento obtenidos por distintas matrices de CS al variar del porcentaje de nanotubos. Como era de esperar, los *scaffolds* de MWCNTs muestran un mayor grado de hinchamiento para las matrices con menor cantidad de CS. Esto se debe a que una mayor cantidad de polímero favorece un mayor entrecruzamiento, y por tanto, una menor capacidad de adsorber el agua. Para los *scaffolds* de NHTS se observa un menor hinchamiento con respecto a los correspondientes *scaffolds* de MWCNTs análogos. Esta diferencia puede explicarse considerando una mayor presencia de grupos carboxilos en las matrices con NHTS, que favorecen un mayor entrecruzamiento y por tanto, un menor hinchamiento.

Tabla 6.1. Valores de grado de hinchamiento obtenidos para diversos *scaffolds* preparados con distintas proporciones de MWCNTs (o NHTS) y sulfato de condroitina (CS), entrecruzados y no con HMDI.

MWCNTs %	CS 1%	CS 4%	NHTS %	CS 1%
2,5 %	94.3	91.3	2,5 %	---
4 %	94.1	90.2	5 %	92.5
5 %	93.9	89.3	6 %	90.8
6 %	93.2	88.9	8 %	90.8
8 %	91.1	88.4	10 %	89.3
10 %	89.9	86.3	12 %	87.9
12 %	88.3	85.3	15 %	86.0
15 %	86.6	84.4	18 %	84.5
18 %	83.7	83.9	21 %	81.9

También se ha analizado la morfología de los soportes mediante micrografías de SEM, después de someterlos a un proceso de hinchamiento, para comprobar que la estructura no presenta variaciones en su morfología ([Fig. 6.14](#)). Este estudio, preliminar y sencillo, es de vital importancia para asegurar que el soporte poroso mantiene, tanto la morfología como sus propiedades, en aquellas aplicaciones que requieren empleo de disoluciones. Efectivamente, se observa que después de las pruebas de hinchamiento en PBS, durante por lo menos por una semana, los soportes conservan su estructura.

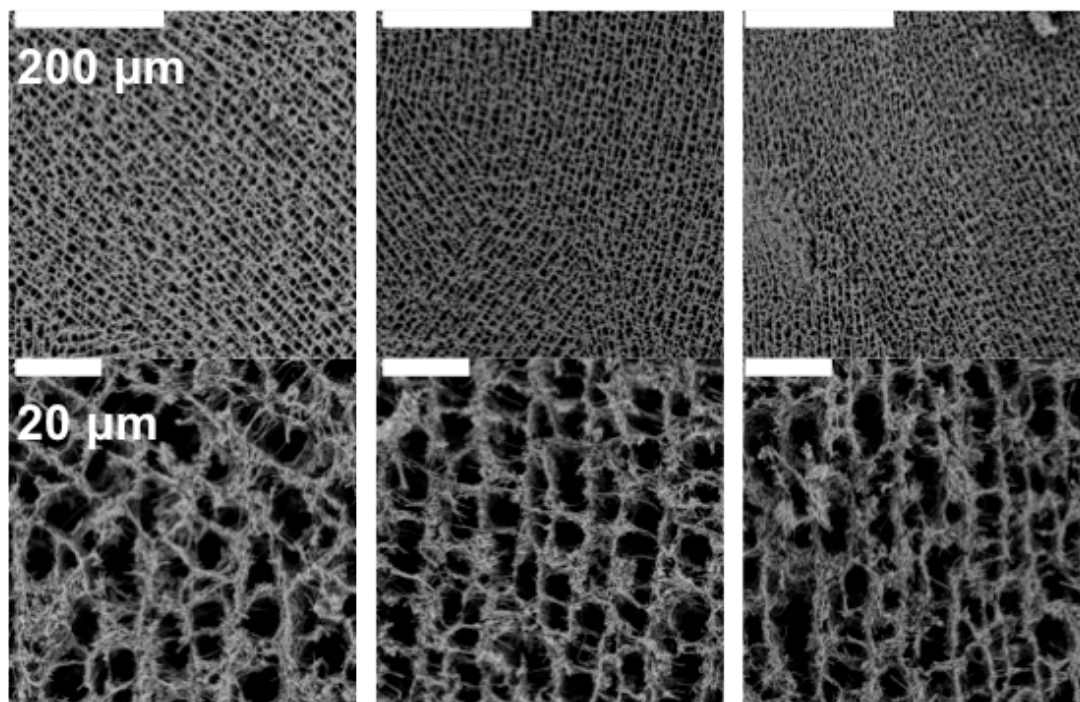


Figura 6.14. Micrografías de SEM de un *scaffold* CS3W6, antes de entrecruzar con HMDI (columna izquierda), de un *scaffold* CS3W6H, después entrecruzar con HMDI (columna central), y del mismo después de prueba de hinchamiento en PBS 0.1M (columna derecha).

6.4.3. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

El análisis termogravimétrico (TGA) permite los cambios de masa de una muestra sometida a un programa de calentamiento (ver apartado 3.2.2.5.4). Estas pérdidas de masa se utilizan para calcular o aproximar la cantidad de fase que se descompone. Todos los termogramas de los *scaffolds* analizados son similares y presentan un único proceso de degradación térmica (Fig. 6.15 y 6.16). No obstante, se observan variaciones ligeras en la temperatura de máxima velocidad de descomposición (T_{md}). En todos casos el valor de masa residual (M) corresponde con los distintos contenidos en nanotubos de carbono.

En la figura 6.16 el mayor porcentaje de pérdida de peso depende de la presencia del mayor porcentaje de polímero incorporado en el soporte.

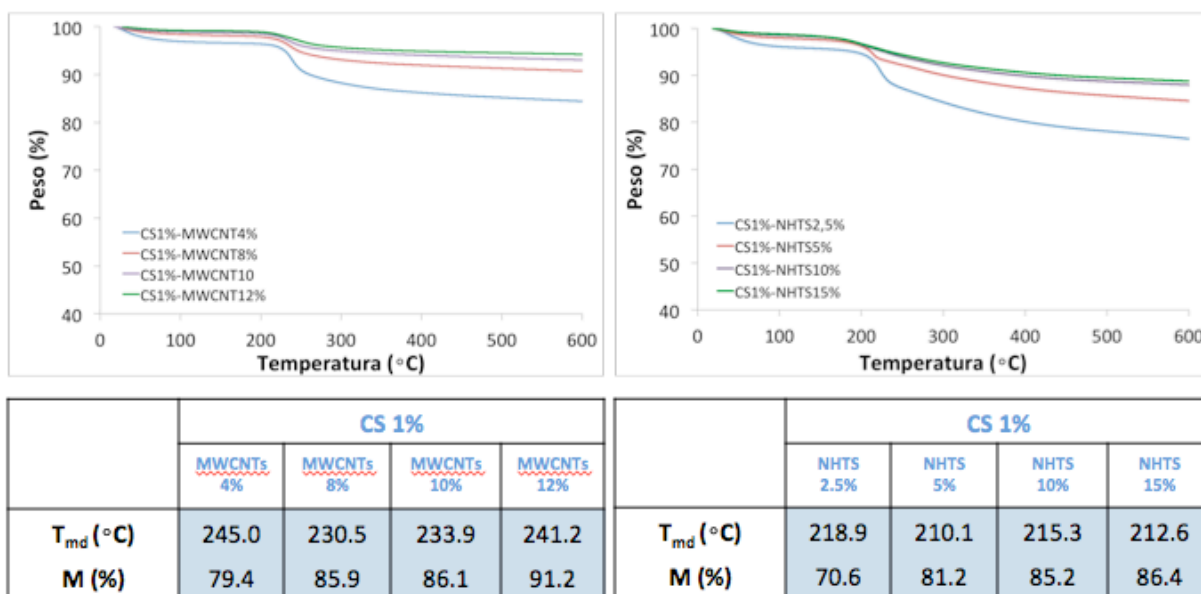


Figura 6.15. Termogramas (TGA) de muestras de *scaffolds* de CS 1% p/p con diferentes concentraciones de MWCNTs (izquierda) y NHTS (derecha) y correspondientes tablas con los valores de la temperatura de máxima velocidad de descomposición (T_{md}) y masa residual (M) a 600°C.

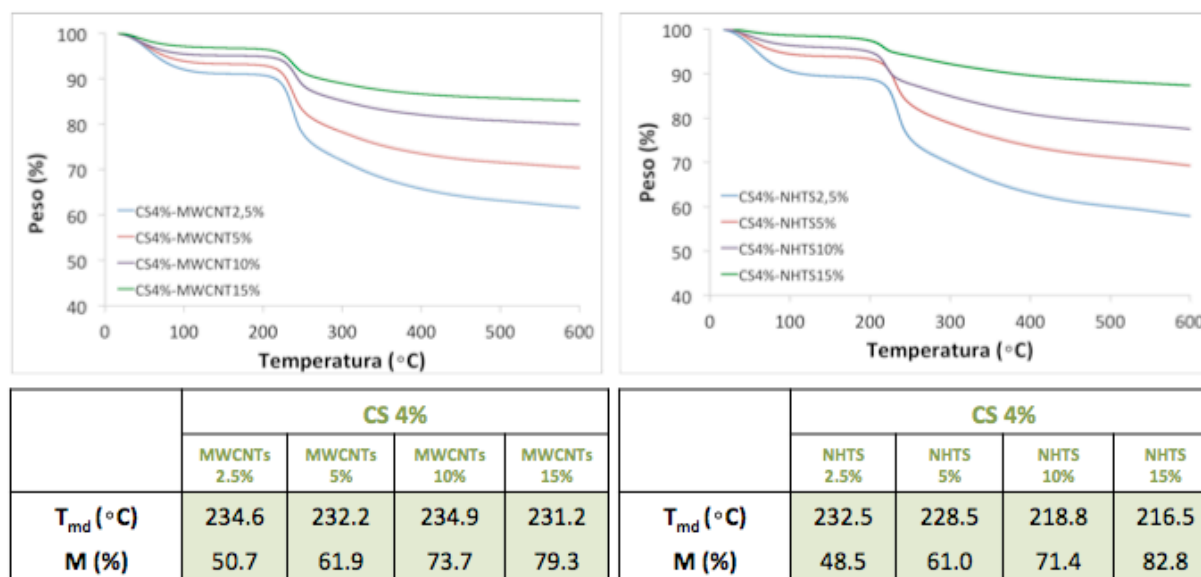


Figura 6.16. Termogramas (TGA) de muestras de *scaffolds* de CS 4% p/p con diferentes concentraciones de MWCNTs (izquierda) y NHTS (derecha) y correspondientes tablas con los valores de la temperatura de máxima velocidad de descomposición (T_{md}) y masa residual (M) a 600°C.

6.4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD

La conductividad de los diferentes *scaffolds* se obtiene usando un método clásico de cuatro puntas. En la [figura 6.17](#) se muestran los gráficos para cada uno de los *scaffolds* preparados con un porcentaje fijo de polímero (para CS a 1%, 2%, 4% y 6% p/p) y un porcentaje variable de cantidad de MWCNTs (de 2.5% hasta 18% p/p). En todos casos se observa como la conductividad de los *scaffolds* aumenta con el contenido de nanotubos, alcanzando un valor máximo de $4.8 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el *scaffold* CS6W15 ([Tabla 6.2](#)).³⁵ También se observa como el aumento de la cantidad de CS (de 1% a 6% p/p) favorece el aumento de la conductividad, cuando la cantidad de nanotubos es muy elevada (12 o 15% p/p) ([Fig. 6.18](#)). Efectivamente, en presencia de grandes cantidades de nanotubos, una mayor cantidad de dispersante permite un mejor empaquetamiento y favorece la interconexión entre los nanotubos a lo largo de la estructura porosa, mejorando la conductividad final del *scaffold*. Por el contrario, los *scaffolds* con menor cantidad de MWCNTs (hasta 10% p/p) no presentan variaciones importantes de conductividad al variar de la cantidad de dispersante ([Fig. 6.19](#)). En *scaffolds* con bajos porcentajes de nanotubos (hasta 8% p/p de MWCNTs), se observa que el entrecruzamiento favorece la estabilidad del sistema y mejora la conductividad con respecto a los *scaffolds* no entrecruzados.

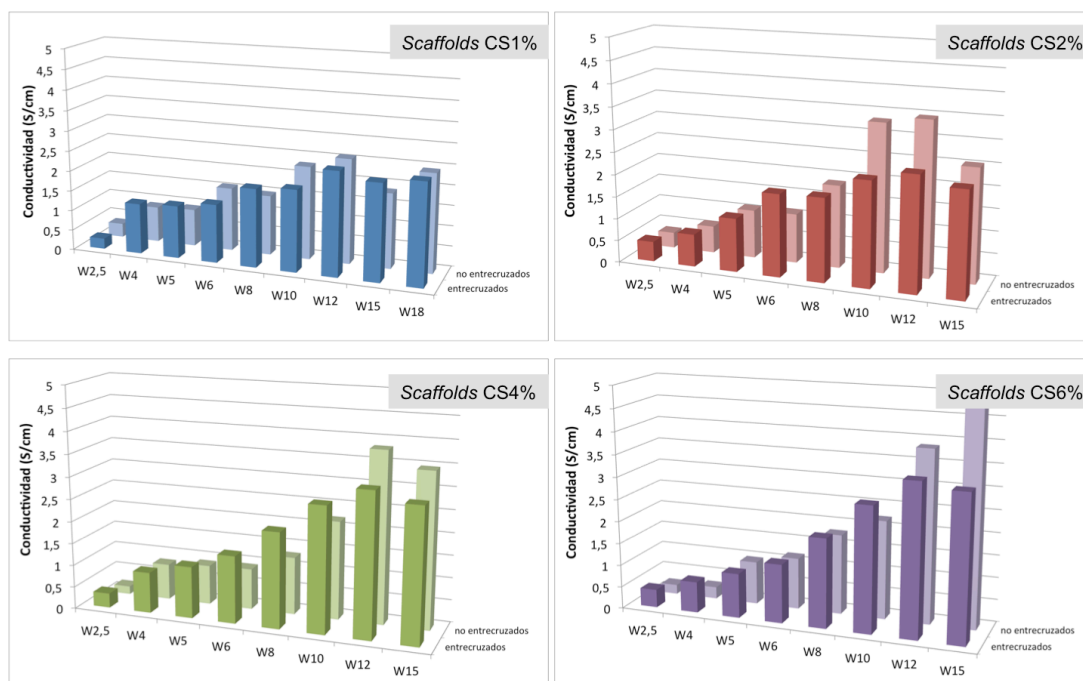


Figura 6.17. Representación de la variación de conductividad para distintos *scaffolds* de CS (1%, 2%, 4% y 6% p/p) al variar de la cantidad de MWCNTs (de 2.5% a 15% p/p). En cada gráfico se representan los resultados para *scaffolds* entrecruzados y los correspondientes no entrecruzados.

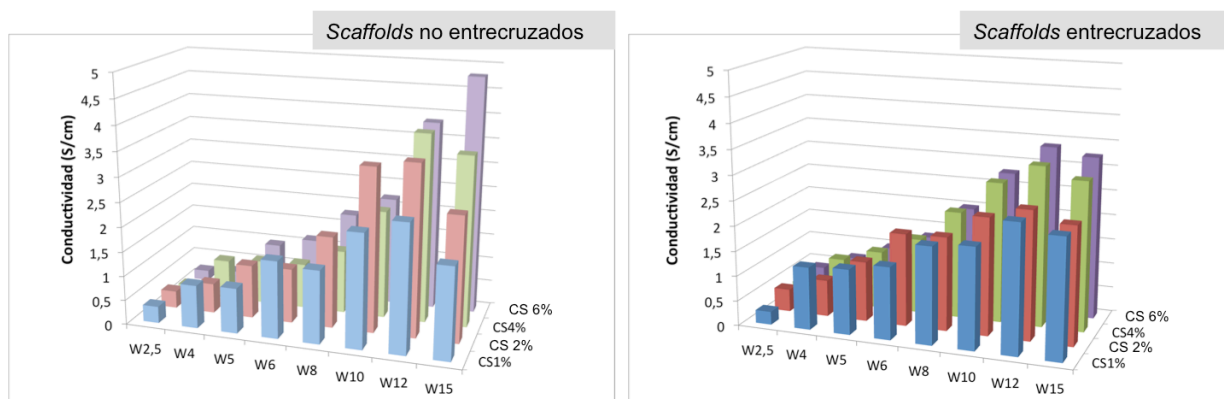


Figura 6.18. Representación global de la variación de conductividad para distintos *scaffolds* de CS (1%, 2%, 4% y 6% p/p) al variar de la cantidad de MWCNTs (de 2.5% a 15% p/p). A la izquierda, gráfico de *scaffolds* no entrecruzados y a la derecha de *scaffolds* entrecruzados.

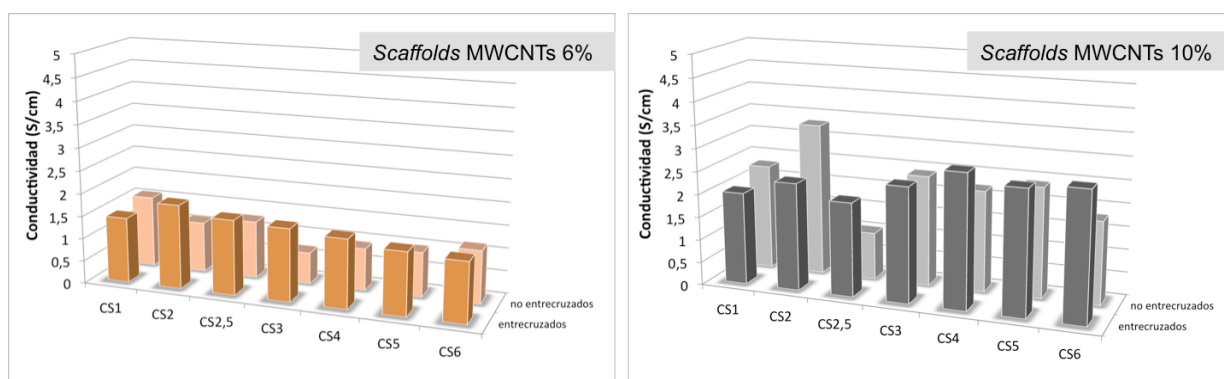


Figura 6.19. Representación de la variación de conductividad para distintos *scaffolds* de CS (de 1% a 6% p/p) al mismo porcentaje de MWCNTs (a la izquierda MWCNTs 6% p/p, y a la derecha MWCNTs 10% p/p). En cada gráfico se representan los resultados para *scaffolds* entrecruzados y los correspondientes no entrecruzados.

Tabla 6.2 Valores de conductividad obtenidos para diversos *scaffolds* construidos con distintas proporciones de MWCNTs y sulfato de condroitina (CS) entrecruzados y no entrecruzados con HMDI.

MWCNTs %	CS 1%		CS 2%		CS 4%		CS 6%	
	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.
2,5 %	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.4	0.2
4 %	1.2	0.9	0.7	0.6	0.9	0.8	0.7	0.3
5 %	1.3	0.9	1.2	1.1	1.2	0.9	1.0	1.0
6 %	1.4	1.6	1.8	1.1	1.5	0.9	1.3	1.2
8 %	1.9	1.5	1.9	1.9	2.1	1.3	2.0	1.8
10 %	2.0	2.3	2.3	3.3	2.8	2.2	2.8	2.1
12 %	2.5	2.6	2.6	3.5	3.2	3.8	3.4	3.6
15 %	2.4	1.9	2.3	2.5	3.0	3.5	3.3	4.8

De modo análogo, se repite el estudio con *scaffolds* preparados con nanotubos cortos, del tipo NHTS. Como en el caso anterior con MWCNTs, se observa que la conductividad de los *scaffolds* aumenta con el contenido en nanotubos, alcanzando un valor máximo de $1.9 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el *scaffold* CS1N21 (Fig. 6.20 y Tabla 6.3).

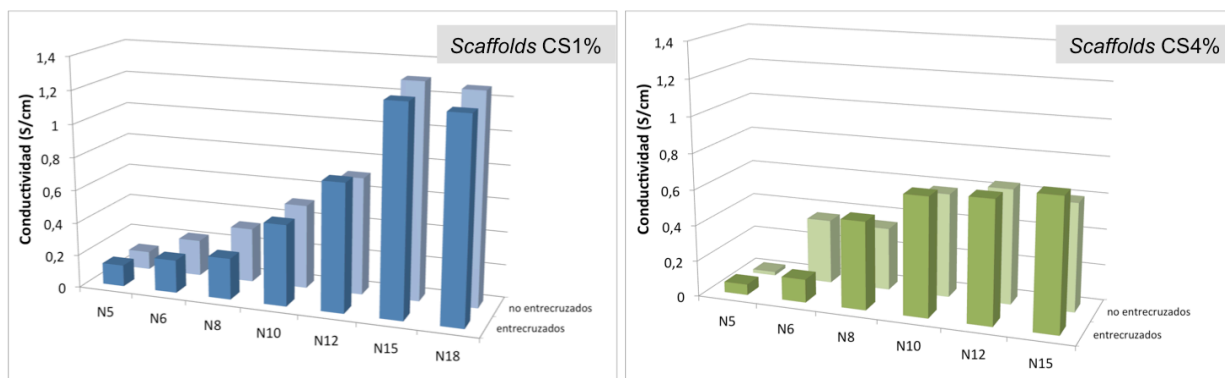


Figura 6.20. Representación de la variación de conductividad para distintos *scaffolds* de CS (1% y 4% p/p) al variar de la cantidad de NHTS (de 5% a 15% p/p). En cada gráfico se representan los resultados para *scaffolds* entrecruzados y los correspondientes no entrecruzados.

En este caso, los valores máximos obtenidos resultan bastante más bajos que los encontrados para los *scaffolds* preparados con MWCNTs. Esta diferencia depende del menor tamaño de los CNTs cortos NHTS con respecto a los MWCNTs, que limita la interconexión entre los nanotubos a lo largo de la estructura porosa, desfavoreciendo la conductividad de las matrices. También puede contribuir a esta disminución de la conductividad la incorporación de defectos en la estructura de los nanotubos en el proceso de oxidación con sulfúrico y ultrasonidos, que, como se ha mencionado, repercute en las propiedades eléctricas intrínsecas de los nanotubos. En los *scaffolds* preparados con NHTS se evidencia que el entrecruzamiento con HMDI no favorece el aumento de la conductividad tal y como se había visto para las otras matrices con MWCNTs (Fig. 6.21).

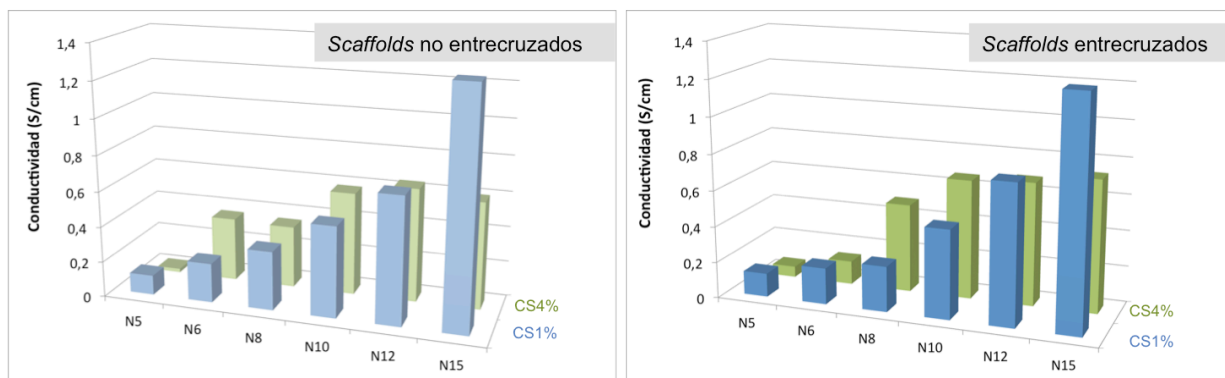


Figura 6.21. Representación global de la variación de conductividad para distintos *scaffolds* de CS (1% y 4% p/p) al variar de la cantidad de NHTS (de 5% a 15% p/p). A la izquierda, gráfico de *scaffolds* no entrecruzados y a la derecha de *scaffolds* entrecruzados.

Tabla 6.3. Valores de conductividad obtenidos para diversos *scaffolds* preparados con distintas proporciones de NHTS y sulfato de condroitina (CS) entrecruzados y no entrecruzados con HMDI.

NHTS %	CS 1%		CS 4%	
	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.
5 %	0.1	0.1	0.0	0.0
6 %	0.2	0.2	0.1	0.4
8 %	0.2	0.3	0.5	0.3
10 %	0.5	0.5	0.7	0.6
12 %	0.8	0.7	0.7	0.6
15 %	1.2	1.3	0.7	0.6
18 %	1.2	1.3	---	---
21 %	1.9	2.4	---	---

Además de todo lo anterior, se realizó un último estudio de conductividad comparando *scaffolds* procesados a distintas velocidades de congelado, tanto con nanotubos MWCNTs como con NHTS (Fig. 6.22). En los dos casos se confirma que cuanto mejor empaquetamiento (función de la velocidad de congelado), mejor es la conductividad de las matrices.

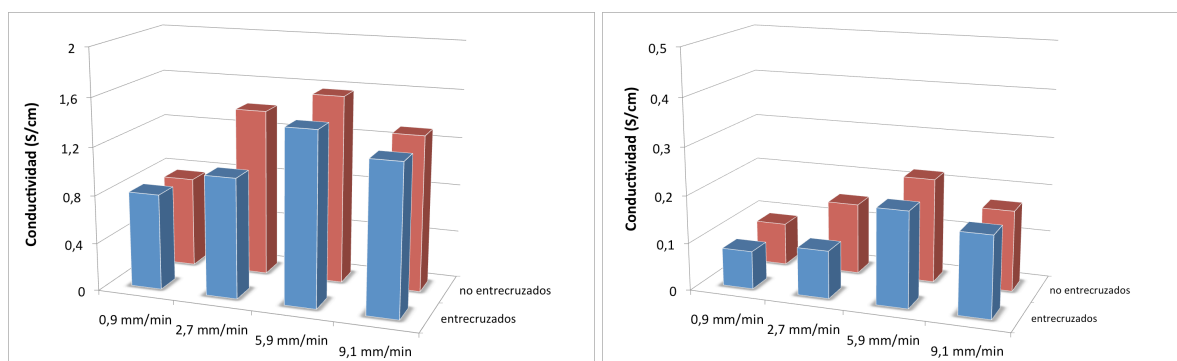


Figura 6.22. Representación global de la variación de conductividad para distintos *scaffolds* de CS1W6 (izquierda) y CS1N6 (derecha) al variar de la velocidad de procesamiento (0.9, 2.7, 5.9 y 9.1 mm/min).

6.4.5. ENSAYOS DE FLEXIÓN A TRES PUNTOS

Con los ensayos de flexión a tres puntos se evalúa el comportamiento esfuerzo-deformación y la resistencia a la flexión de los materiales frágiles. La resistencia a la flexión es equivalente al módulo de rotura en los materiales cerámicos. La ventaja del ensayo de flexión en tres puntos es su simplicidad, y el hecho de que no sea necesario el uso de mordazas para sujetar las muestras.

Según se aprecia en las gráficas (Fig. 6.23-6.24-6.25 y Tabla 6.4), a medida que aumenta la cantidad de nanotubos y la cantidad de polímero dispersante, aumenta el valor del módulo elástico o módulo de Young. Obviamente, el aumento de la cantidad de polímero favorece la elasticidad del material.³⁶ La explicación a este comportamiento es idéntica a la descrita para explicar el aumento de conductividad, es decir, el aumento de la cantidad de polímero favorece el empaquetamiento de los nanotubos. También se observa que el proceso de entrecruzamiento favorece un aumento, aunque modesto, del modulo elástico.

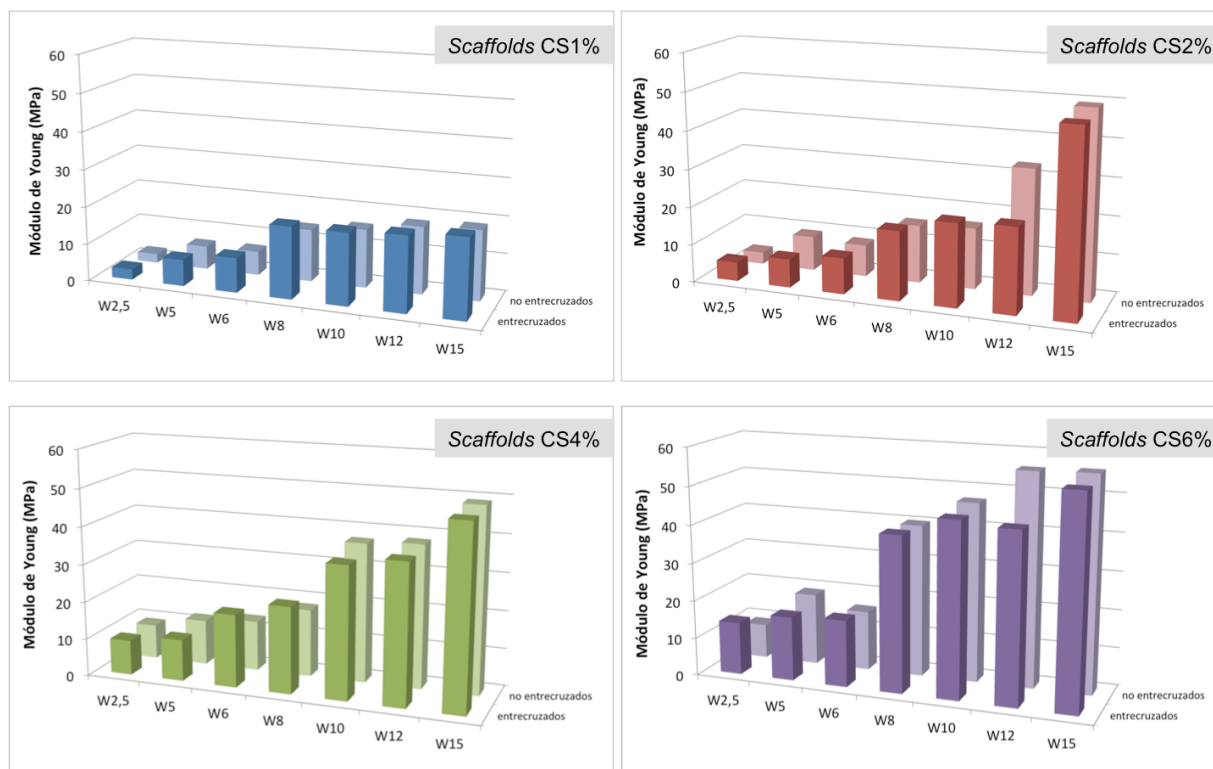


Figura 6.23. Representación de la variación del módulo de Young para distintos *scaffolds* de CS (1%, 2%, 4% y 6% p/p) al variar de la cantidad de MWCNTs (de 2,5% a 15% p/p). En cada gráfico se representan los resultados para *scaffolds* entrecruzados y los correspondientes no entrecruzados.

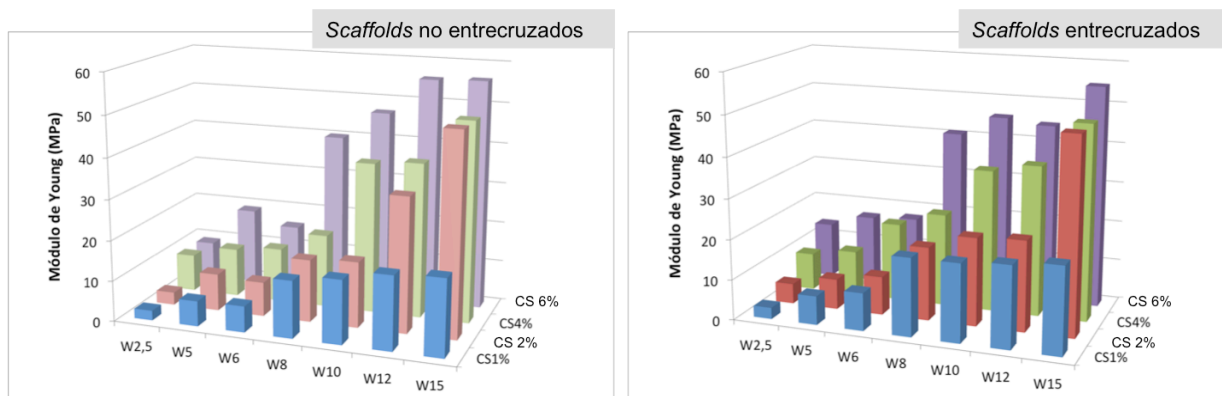


Figura 6.24. Representación global de la variación del módulo de Young para distintos *scaffolds* de CS (1%, 2%, 4% y 6% p/p) al variar de la cantidad de MWCNTs (de 2,5% a 15% p/p). A la izquierda gráfico de *scaffolds* no entrecruzados y a la derecha de *scaffolds* entrecruzados.

Tabla 6.4. Valores del módulo de Young obtenidos para diversos *scaffolds* preparados con distintas proporciones de MWCNTs y sulfato de condroitina (CS) entrecruzados y no con HMDI.

MWCNTs %	CS 1%		CS 2%		CS 4%		CS 6%	
	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.	Entrecr.	No Entrecr.
2,5 %	2.8±0.1	2.4±0.2	5.0±0.2	3.1±0.2	9.3±0.3	9.2±0.2	13.9±0.4	9.1±0.3
5 %	7.1±0.3	6.2±0.2	7.5±0.3	9.1±0.4	11.1±0.4	12.0±0.5	16.9±0.6	18.9±0.4
6 %	9.3±0.4	6.4±0.3	9.5±0.4	8.4±0.3	19.4±0.8	13.3±0.6	17.6±0.6	15.7±0.6
8 %	19.0±0.6	14.0±0.7	18.2±0.5	15.3±0.8	23.0±0.8	18.0±0.8	40.8±1.1	40.0±0.9
10 %	19.3±0.8	15.6±0.5	21.8±0.9	16.1±0.6	35.0±1.0	37.0±0.9	45.7±0.9	46.9±1.1
12 %	20.1±1.0	18.0±0.7	22.4±1.3	33.0±0.3	37.2±0.5	38.1±0.7	44.5±1.1	55.8±1.2
15 %	21.3±1.1	8.7±0.5	48.2±0.8	49.3±0.9	48.2±0.8	49.2±0.6	54.8±0.9	56.2±0.7

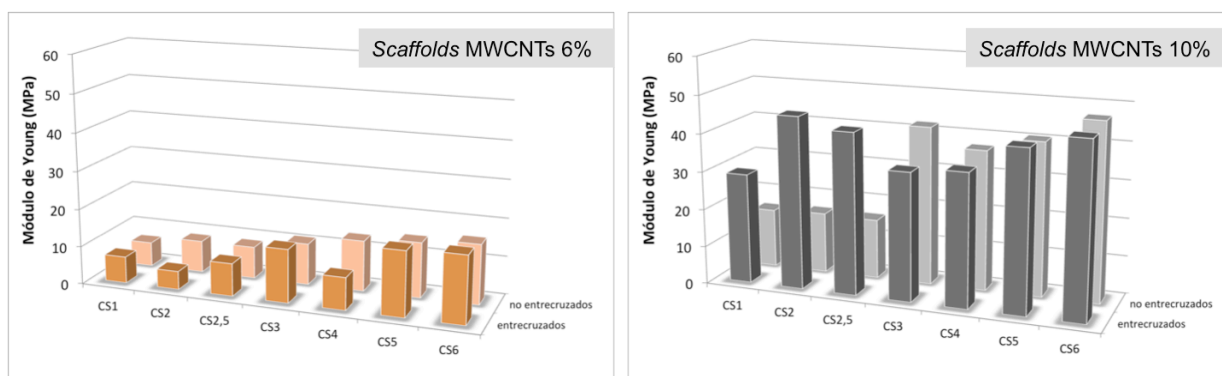


Figura 6.25. Representación de la variación del módulo de Young para distintos *scaffolds* de CS (de 1% a 6% p/p) al mismo porcentaje de MWCNTs (a la izquierda MWCNTs 6% p/p, y a la derecha MWCNTs 10% p/p). En cada gráfico se representan los resultados para *scaffolds* entrecruzados y los correspondientes no entrecruzados.

En el caso de *scaffolds* con NHTS (Fig. 6.26-6.27 y Tabla 6.5) se observa que el módulo elástico es también dependiente del contenido de polímero, aunque en valores absolutos sea menor que el de los *scaffolds* con MWCNTs.

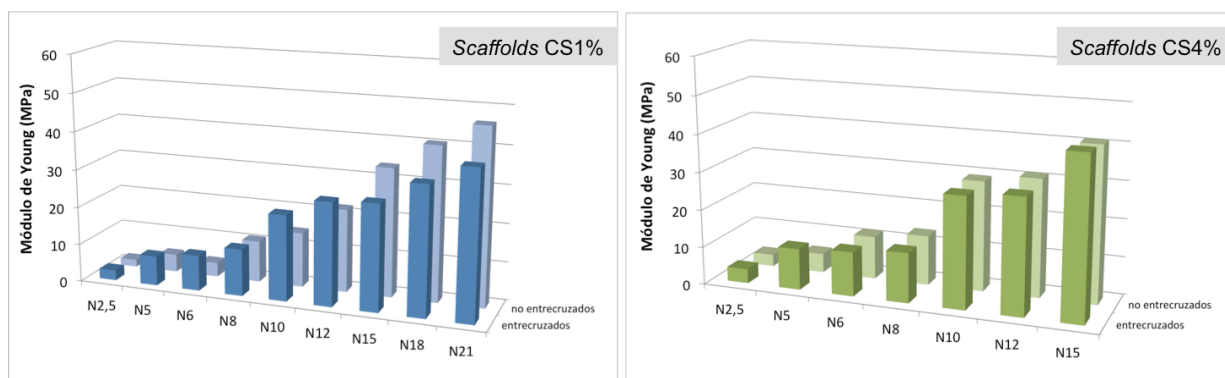


Figura 6.27. Representación de la variación del módulo de Young para distintos *scaffolds* de CS (1% y 4% p/p) al variar de la cantidad de NHTS (de 5% a 15% p/p). En cada gráfico se representan los resultados para *scaffolds* entrecruzados y los correspondientes no entrecruzados.

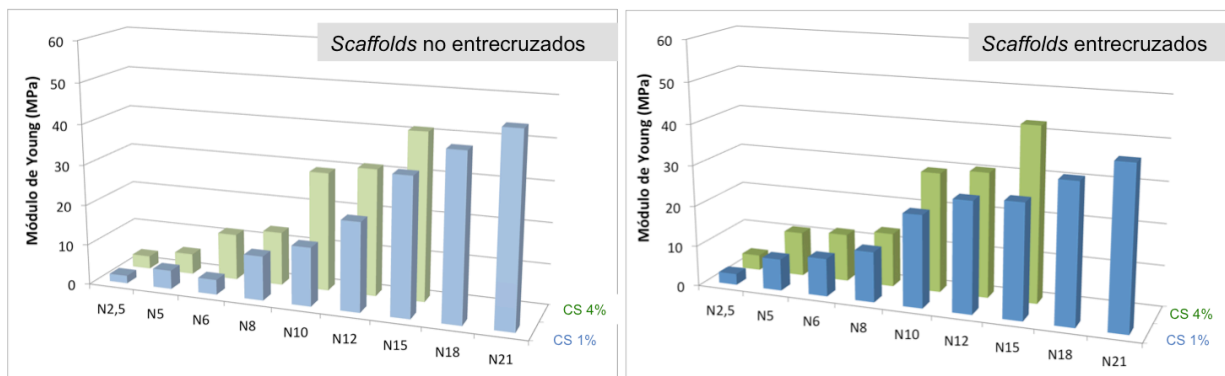


Figura 6.28. Representación global de la variación del módulo de Young para distintos *scaffolds* de CS (1% y 4% p/p) al variar de la cantidad de NHTS (de 5% a 15% p/p). A la izquierda gráfico de *scaffolds* no entrecruzados y a la derecha de *scaffolds* entrecruzados.

Tabla 6.5. Valores del módulo de Young obtenidos para diversos *scaffolds* preparados con distintas proporciones de NHTS y sulfato de condroitina (CS) entrecruzados y no, con HMDI.

NHTS %	CS 1%		CS 4%	
	<u>Entrecr.</u>	<u>No Entrecr.</u>	<u>Entrecr.</u>	<u>No Entrecr.</u>
2,5 %	2.7±0.1	1.9±0.2	3.8±0.1	3.2±0.1
5 %	5.8±0.4	4.6±0.5	10.9±0.5	5.1±0.3
6 %	5.3±0.4	3.7±0.6	11.7±0.6	11.4±0.5
8 %	12.3±0.6	10.9±0.6	13.2±0.7	13.2±0.7
10 %	22.5±1.0	14.4±0.7	29.3±1.1	29.2±0.9
12 %	27.0±0.9	21.8±1.0	30.5±1.3	31.2±0.9
15 %	27.8±0.8	33.7±1.1	42.5±1.5	41.1±0.8
18 %	33.7±1.0	40.4±1.2	---	---
21 %	38.8±1.2	46.2±1.4	---	---

6.5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En resumen, la metodología ISISA permite construir estructuras tridimensionales macroporosas de nanotubos de carbono dispersados en sulfato de condroitina. El entrecruzamiento con HMDI permite evitar el desmoronamiento de las matrices en disolución acuosa, donde el sulfato de condroitina es soluble, sin alterar la estructura porosa en forma de microcanales. Los *scaffolds* obtenidos presentan buenas propiedades mecánicas y de conductividad, que pueden ser moduladas variando las condiciones de síntesis. Por ejemplo, el aumento de la concentración del polímero usado como agente dispersante o la concentración de nanotubos de carbono.

Los estudios realizados también muestran como la utilización de los nanotubos cortos (NHTS) influye notablemente en las propiedades del soporte, y principalmente, en su conductividad.

6.6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ J. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon" *Nature* 354 (1991) 56-58.
- ² M. Monthieux, V.L. Kuznetsov, "Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes?" *Carbon* 44 (2006) 1621-1625.
- ³ C.N.R. Rao, B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, "Nanotubes" *ChemPhysChem* 2 (2001) 78-105
- ⁴ M. Tan, Z. Zhang, L. Zhao, J. Zhang, "Review of fabrication methods of nanotube/nanowire devices" *Advanced Materials Research* 411 (2012) 427-431.
- ⁵ S. Hong, S. Myung, "Nanotubes electronics: a flexible approach to mobility" *Nature Nanotechnology* 2 (2007) 207-208.
- ⁶ P. Bradford, A. Bogdanovich, "Electrical conductivity study of carbon nanotube yarns, 3-d hybrid braids and their composites" *Journal of Composite Materials* 42 (2008) 1533-1545.
- ⁷ D. Qian, G.J. Wagner, W.K. Liu, M.F. Yu, R.S. Ruoff, "Mechanics of carbon nanotubes" *Applied Mechanics Reviews* 55 (2002) 495-533.
- ⁸ M.-F. Yu, O. Louries, M.J. Dyer, K. Moloni, T.F. Kelly, R.S. Ruoff, "Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load" *Science* 287 (2000) 637-640.
- ⁹ X. Zhao, R. Liu, "Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell and biomacromolecule levels" *Environment International* 40 (2012) 244-255.
- ¹⁰ P.M. Ajayan, O. Stephan, C. Colliex, D. Trauth, "Aligned carbon nanotube arrays formed by cutting a polymer resin-nanotube composite" *Science* 265 (1994) 1212-1214.
- ¹¹ Y. Yan, M.B. Chan-Park, Q. Zhang, "Advances in carbon-nanotube assembly" *Small* 1 (2007) 24-42.
- ¹² R.H. Baughman, "Materials synthesis: Towering forests of nanotube trees" *Nature Nanotechnology* 1 (2006) 94-96.
- ¹³ Y.J. Jung, S. Kar, S. Talapatra, C. Soldano, G. Viswanathan, X. Li, Z. Yao, F.S. Ou, A. Avadhanula, R. Vajtai, S. Curran, O. Nalamasu, P.M. Ajayan, "Aligned carbon nanotube-polymer hybrid architectures for diverse flexible electronic applications" *Nano Letters* 6 (2006) 413-418.
- ¹⁴ H. Liu, S. Li, J. Zhai, H. Li, Q. Zheng, L. Jiang, D. Zhu, "Self-assembly of large micropatterns on aligned carbon nanotube films" *Angewandte Chemie International Edition* 43 (2004) 1146-1149.
- ¹⁵ M.A. Correa-Duarte, N. Wagner, J. Rojas-Chapana, C. Morszeck, M. Thie, M. Giersig, "Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth" *Nano Letters* 4 (2004) 2233-2236.
- ¹⁶ Y. Yang, M.C. Gupta, K.L. Dudley, R.W. Lawrence, "Novel carbon nanotube-polystyrene foam composites for electromagnetic interference shielding" *Nano Letters* 5 (2005) 2131-2134.
- ¹⁷ X.-B. Xu, Z.M. Li, L. Shi, X.C. Bian, Z.D. Xiang, "Ultralight conductive carbon nanotube polymer composite" *Small* 3 (2007) 408-411.
- ¹⁸ M. Nabeta, M. Sano, "Nanotube foam prepared by gelatin gel as a template" *Langmuir* 21 (2005) 1706-1708.
- ¹⁹ M.B. Bryning, D.E. Milkie, M.F. Islam, L.A. Hough, J.M. Kikkawa, A.G. Yodh, "Carbon nanotube aerogels" *Advanced Materials* 19 (2007) 661-664.
- ²⁰ C. Lau, M.J. Cooney, P. Atanassov, "Conductive macroporous composite chitosan/carbon nanotube scaffolds" *Langmuir* 24 (2008) 7004-7010.

- ²¹ L.Y. Yan, W. Li, S. Mesgari, S.S.J. Leong, Y. Chen, L.S. Loo, Y. Mu, M.B. Chan-Park, "Use of a chondroitin sulfate isomer as an effective and removable dispersant of single-walled carbon nanotubes" *Small* 19 (2011) 2758-2768.
- ²² P.A. Tran, L. Zhang, T.J. Webster, "Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine" *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1097-1114.
- ²³ A. Hirsch, "Functionalization of single-walled carbon nanotubes" *Angewandte Chemie - International Edition* 41 (2002) 1853-1859.
- ²⁴ S. Banerjee, M.G.C. Kahn, S.S. Wong, "Rational chemical strategies for carbon nanotube functionalization" *Chemistry - A European Journal* 9 (2003) 1898-1908.
- ²⁵ P. Garga, J.L. Alvarado, C. Marsh, T.A. Carlson, D.A. Kessler, K. Annamalai, "An experimental study on the effect of ultrasonication study on the effect of ultrasonication on viscosity and heat transfer performance of multi-wall carbon nanotube-based aqueous nanofluids" *International Journal of Heat and Mass Transfer* 52 (2009) 5090-5101.
- ²⁶ Y. Qin, J. Shi, W. Wu, X. Li, Z.-X. Guo, D. Zhu, "Concise route to functionalized carbon nanotubes" *The Journal of Physical Chemistry B* 107 (2003) 12899-12901.
- ²⁷ B. Vigolo, V. Mamane, F. Valsaque, T.N.H. Le, J. Thabit, J. Ghanbaja, L. Aranda, Y. Fort, E. McRae, "Evidence of sidewall covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes and its advantages for composite processing" *Carbon* 47 (2009) 411-419.
- ²⁸ I.T. Amr, A. Al-Amer, S., S. Thomas P, M. Al-Harhi, S. A. Girei, R. Sougrat, M.A. Atieh, "Effect of acid treated carbon nanotubes on mechanical, rheological and thermal properties of polystyrene nanocomposites" *Composites: Part B* 42 (2011) 1554-1561.
- ²⁹ M.C. Gutiérrez, Z.Y. García-Carvajal, M. Jobbágy, F. Rubio, L. Yuste, F. Rojo, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies for drug delivery and controlled release" *Advanced Functional Materials* 17 (2007) 3505-3513.
- ³⁰ S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 27 (2006) 5480-5489.
- ³¹ S.R. Mukai, H. Nishihara, H. Tamon, "Formation of monolithic silica gel microhoneycombs (SMHs) using pseudosteady state growth of microstructural ice crystals" *Chemical Communications* (2004) 874-875.
- ³² T. Shimokuri, T. Kaneko, M. Akashi, "Specific thermosensitive volume change of biopolymer gels derived from propylated poly(γ -glutamate)s" *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 42 (2004) 4492-4501.
- ³³ R. Pauliukaite, M.E. Ghica, O. Fatibello-Filho, C.M.A. Brett, "Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan films supported on a graphite-epoxy composite electrode" *Analytical Chemistry* 81 (2009) 5364-5372.
- ³⁴ Y. Garcia, N. Hemantkumar, R. Collighan, M. Griffin, J.C. Rodriguez-Cabello, A. Pandit, "In vitro characterization of a collagen scaffold enzymatically cross-linked with a tailored elastin-like polymer" *Tissue Engineering: Part A* 15 (2009) 887-899.
- ³⁵ L.J. Sweetaman, S.E. Moulton, G.G. Wallace, "Characterization of porous freeze dried conducting carbon nanotube-chitosan scaffolds" *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008) 5417-5422.
- ³⁶ K.P.-A. Saffar, A.R. Arshi, N. JamilPour, A.R. Najafi, G. Rouhi, L. Sudak, "A cross-linking model for estimating Young's modulus of artificial bone tissue grown on carbon nanotube scaffold" *Journal of Biomedical Materials Research A* 94 (2010) 594-602.

VII. *SCAFFOLDS* DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

7.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en el capítulo anterior, el descubrimiento de las excelentes propiedades químicas, mecánicas y eléctricas de los nanotubos de carbono (CNTs) ha promovido la aplicación de estos materiales en distintas áreas de investigación con el fin de obtener estructuras híbridas multifuncionales en las que combinar una alta conductividad eléctrica, estabilidad química, y fuerza física con flexibilidad estructural.¹⁻²

La preparación de estructuras híbridas multifuncionales con CNTs para aplicaciones en sistemas biológicos es un área de investigación muy novedosa.³⁻⁴ En la actualidad, existen principalmente cuatro áreas aplicadas relevantes para la ciencia de materiales interesadas en el uso de CNTs.⁵ Los nanotubos de carbono pueden ser empleados como agentes de contraste para el marcaje celular,⁶⁻⁷ en el diseño de biosensores,⁸⁻⁹ en la liberación génica y de fármacos (*gene and drug delivery*),¹⁰⁻¹¹ y en la preparación de soportes para el crecimiento tisular (*Tissue Engineering*) (Fig. 7.1).¹²⁻¹³

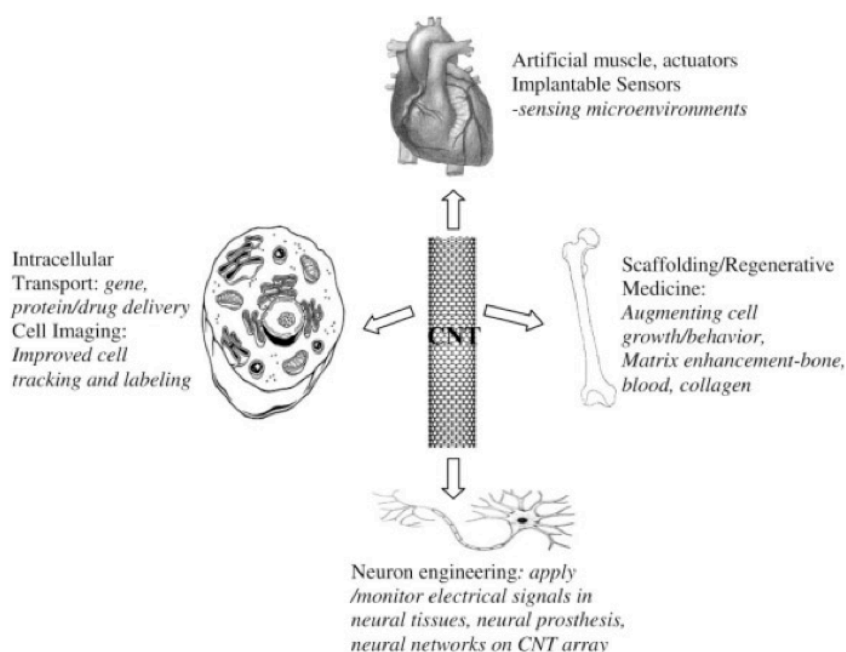


Figura 7.1. Potenciales aplicaciones biológicas de materiales con CNTs.¹⁴

7.1.1. BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS CNTs

En el estudio de un biomaterial, uno de los parámetros cruciales que debe ser examinado antes de explorar cualquier aplicación *in vivo* es su biocompatibilidad. En términos generales, se entiende por biocompatibilidad la cualidad de un material de no inducir efectos tóxicos o

dañinos sobre sistemas biológicos, así como su capacidad para inducir una respuesta apropiada por el receptor con un fin específico.¹⁵

Aunque los CNTs han sido extensamente explorados en aplicaciones biológicas, su biocompatibilidad todavía suscita controversia, dada la existencia de resultados contradictorios.¹⁶⁻¹⁷ En la bibliografía pueden encontrarse ejemplos de estudios *in vitro* que demuestran un grado variable de citotoxicidad,¹⁸⁻¹⁹ mientras que otros los describen como excelentes sustratos para el crecimiento celular con efectos citotóxicos despreciables.²⁰⁻²¹⁻²² Estas discrepancias son debidas, al menos en parte, al elevado número de variables que intervienen en los ensayos de citotoxicidad y que dificultan la comparación directa entre estudios (tipo de CNTs empleados y tamaño, parámetros celulares analizados, tipo de células cultivadas, tiempos de cultivo, etc.). Por ejemplo, estudios realizados por el grupo de Nicolini han demostrado que la viabilidad de células H9c2(2-1), una línea celular de músculo cardíaco de rata, no se ve afectada a corto plazo (1-3 días) por la presencia de nanotubos SWCNTs, pero sí a tiempos más largos.²³ También se ha evaluado el efecto de la presencia de CNTs en la formación de matriz extracelular mediante el uso de materiales híbridos de colágeno y CNTs funcionalizados. En estos estudios se ha observado que la presencia de CNTs no altera la formación del gel de colágeno y que la viabilidad celular se mantiene elevada de modo uniforme en toda la matriz, sin alteración de la morfología celular.²⁴ Incluso algunos estudios han mostrado la capacidad de materiales compuestos del tipo SWCNT/polielectrolito para favorecer la diferenciación a neuronas de células progenitoras neuronales de ratón.²⁵

En términos generales, la citotoxicidad de los CNTs ha sido asociada a diversos factores. En primer lugar, los efectos citotóxicos encontrados se han atribuido, en gran medida, a sus dimensiones nanométricas y su estructura tubular, dado que el grafito, la forma alotrópica del carbono con mayor semejanza estructural de los CNTs, no es citotóxico.²⁶⁻²⁷ Adicionalmente, hay estudios que demuestran que la citotoxicidad de los CNTs depende del porcentaje de impurezas en la muestra, del grado de dispersión que puedan alcanzar los CNTs y del tipo de funcionalización.²⁸⁻²⁹ En conclusión, entre los principales factores que parecen ser responsables de la citotoxicidad de los CNTs podrían citarse su morfología, la dificultad para alcanzar una dispersión homogénea en un medio fisiológico y la presencia de carbón amorfo y/o trazas de los catalizador metálicos procedentes de su síntesis. En base a estos resultados, las estrategias más exploradas para minimizar la citotoxicidad de los CNTs se centran en el desarrollo de tratamientos de purificación y en la optimización de la dispersión de los CNTs en fluidos fisiológicos.

7.1.2. SOPORTES DE CNTs EN INGENIERÍA DE TEJIDOS: ESTADO DEL ARTE

A pesar de la controversia existente en lo concerniente a la citotoxicidad de los CNTs, sus excelentes propiedades mecánicas y eléctricas, junto con los resultados alentadores de algunos estudios de biocompatibilidad, han propiciado la consideración de los CNTs como candidatos ideales para la preparación de *scaffolds* para Ingeniería de tejidos, fundamentalmente tejidos óseo y nervioso.

7.1.2.1. Soportes de CNTs para la regeneración de tejido óseo

El tejido óseo es un tejido duro del organismo humano que desempeña distintas funciones cruciales, entre las que destacan su papel estructural de soporte y locomotor (resultado de su interacción con los músculos y las articulaciones), así como sus funciones hematopoyético, y de almacén de calcio y fosfato.³⁰ Por lo tanto, al diseñar un material para uso como soporte óseo, las propiedades mecánicas del material se convierten en factores críticos a considerar. Dada la excelente resistencia mecánica de los CNTs, es natural que muchos estudios se hayan centrado en el uso de nanoestructuras de carbono como agentes de refuerzo en materiales compuestos para la preparación de soportes óseos.³¹⁻³² Además, en comparación con otros *scaffolds* óseos metálicos o cerámicos utilizados en ortopedia (como el titanio, el acero inoxidable, el aluminio, etc), los CNTs son menos densos y, por lo tanto, capaces de formar soportes más ligeros con elevada resistencia, además de ser muy flexibles y de presentar un elevado módulo de Young.³³⁻³⁴

Uno de los primeros estudios que explora el uso de CNTs en la preparación de *scaffolds* para regeneración de tejido óseo describe la formación de materiales preparados dispersando nanofibras de carbono en policarbonato. En particular, los materiales con fibras de carbono más pequeña (de dimensiones nanométricas) indujeron una adhesión celular diferencial, es decir, promovieron la adhesión de osteoblastos, pero no la de otras células como fibroblastos, condrocitos y células de músculo liso.³⁵ El hecho de que el material pudiese promover la adhesión diferencial de osteoblastos y, al mismo tiempo, disminuir la adhesión celular competitiva de otros tipos celulares circundantes, es muy deseable en implantes ortopédicos ya que, *in vivo*, el material “selectivo” puede conducir a una integración más rápida del implante en el hueso nativo. Adicionalmente, las destacadas propiedades adsorbentes de los CNTs permiten la adición de mediadores celulares (factores de crecimiento, hormonas, etc.) con la finalidad de estimular funciones celulares específicas, como se ha demostrado con células mioblásticas de ratón sembradas sobre *scaffolds* de MWCNTs.³⁶⁻³⁷

7.1.2.2. Soportes de CNTs para la regeneración de tejido nervioso

Como campo emergente interdisciplinar, la Ingeniería de tejido nervioso ha suscitado un creciente interés en el desarrollo de nuevos soportes biológicos que restauren, mantengan o mejoren las funciones del tejido neuronal. Actualmente, las enfermedades que afectan al sistema nervioso representan un problema clínico de gran relevancia a nivel mundial. Debido a la complejidad anatómica y funcional del sistema nervioso, la reparación de nervios dañados, así como su recuperación funcional, es un verdadero reto cuando se compara con la reparación de otros tejidos (por ejemplo, el tejido óseo). El sistema nervioso central (SNC; i.e. cerebro y médula espinal) y el sistema nervioso periférico (SNP; nervios espinales y autónomos) son las dos partes principales del sistema nervioso humano.³⁸⁻³⁹ Interesantemente, los procesos de reparación nerviosa en el SNC están mucho menos favorecidos que en el SNP. Por otro lado, las prácticas tradicionales de cirugía de tejido nervioso (implante de autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y sondas de silicio para el diagnóstico y el tratamiento continuo de tejido neural) no satisfacen actualmente las exigencias funcionales de los pacientes. En el caso concreto de los autoinjertos, donde se emplean nervios obtenidos de otras partes del cuerpo, existe una importante limitación de disponibilidad, unida a las deficiencias funcionales en la zona donadora derivadas de la extirpación de dichos nervios (*doner site morbidity*).⁴⁰⁻⁴¹ Por otra parte, el empleo de aloinjertos y xenoinjertos lleva asociado un importante riesgo de transmisión de enfermedades y de activación de la respuesta inmune del organismo, lo que conduce, en ambos casos, al fracaso de los implantes.⁴²⁻⁴³ El uso de sondas de silicio u otras aleaciones metálicas aumenta significativamente la resistencia eléctrica entre la sonda y el tejido, limitando así la eficacia de la estimulación eléctrica y reduciendo la utilidad de las sondas durante la terapia.⁴⁴⁻⁴⁵ También se han explorado para la regeneración de tejido nervioso otros biomateriales de naturaleza polimérica, fabricados en forma de conductos nerviosos. Estos materiales tienen como principales limitaciones sus propiedades mecánicas y eléctricas, en muchos casos inadecuadas para el entorno del tejido nervioso en el que se han de implantar, así como potenciales problemas de biocompatibilidad.⁴⁶

Desde el descubrimiento de los CNTs,⁴⁷⁻⁴⁸ ha habido un notable incremento en el estudio de estos materiales para promover la regeneración de tejido nervioso.⁴⁹⁻⁵⁰ Los CNTs, que son sistemas nanoestructurados al igual que el tejido nervioso, son excelentes candidatos para la reparación de este tejido.⁵¹⁻⁵² En particular, con el rápido desarrollo de tecnologías de producción de CNTs, se ha sintetizado una gran variedad de nanotubos de carbono con diferentes longitudes y anchuras, habiendo sido ampliamente estudiados para diversas

aplicaciones neuronales.⁵³⁻⁵⁴ Por ejemplo, se ha demostrado que los MWCNTs se pueden utilizar para aumentar la adhesión y el crecimiento de las células nerviosas,⁵⁵ y que su funcionalización química con diferentes moléculas bioactivas puede mejorar la actividad celular en los procesos de regeneración neural.⁵⁶ Además, se ha comprobado que la alta conductividad eléctrica de los CNTs mejora la actividad eléctrica de la red neuronal.⁵⁷⁻⁵⁸ En la bibliografía existen numerosos ejemplos de soportes sintéticos fabricados en 2D (*films*) y 3D (*scaffolds*) para regeneración de tejido nervioso.⁵⁹ Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de las matrices polímero/CNTs, y asumiendo también el mantenimiento de la biocompatibilidad de dichos materiales, se han desarrollado sistemas en capa de polímero y SWCNTs a través de los cuales se han obtenido soportes con una resistencia excepcional a la tracción, incluso superior a la de las cerámicas.⁶⁰ Estudios adicionales han puesto en evidencia que las neuronas cultivadas sobre una multicapa de SWCNTs, no sólo conservan sus propiedades electrofisiológicas, sino que además, la estimulación eléctrica que éstas experimentan a través del soporte favorece los procesos de reparación nerviosa.⁶¹

7.1.3. SOPORTES 3D DE CNTs MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA

Como se ha comentado anteriormente, para conseguir una regeneración tisular exitosa es indispensable proveer a las células de un ambiente similar al de la matriz extracelular. Esto implica la necesidad de diseñar soportes que faciliten la distribución celular y guíen la regeneración tisular en tres dimensiones. En base a los conocimientos adquiridos en los capítulos precedentes, se aplica la metodología ISISA como ruta biocompatible para construir estructuras macroporosas de CNTs. A continuación se describe, en primer lugar la preparación de estructuras 3D organizadas de nanotubos de carbono con distintos tipos de biopolímeros (*scaffolds*). Posteriormente, se muestran los estudios de caracterización químico-física de los soportes preparados, y por último, los experimentos de biocompatibilidad in vitro realizados con estos *scaffolds* como soportes para el crecimiento celular. La posibilidad de preparar soportes porosos formados por distintos tipos de polímeros permite ampliar el abanico de aplicaciones de estos *scaffolds* en diferentes campos de la Ingeniería de tejidos. El objetivo concreto de estos estudios es, por lo tanto, crear un biomaterial multifuncional de estructura jerárquica y conductor, que tenga buenas propiedades mecánicas y que sea, además, biocompatible. Para tal fin se han preparado soportes porosos con dos tipos de nanotubos de carbono (MWCNTs y NHTS) en diferentes polímeros, incluyendo quitosano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, elastina y gelatina.

7.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SCAFFOLDS DE CNTs

La preparación y caracterización de los *scaffolds* de CNTs preparados sigue la misma metodología de los estudios mostrados en el Capítulo 6. Así mismo, los nanotubos usados en este capítulo son los descritos anteriormente ([ver apartado 3.2.2.1](#)).

7.2.1. PREPARACIÓN DE SCAFFOLDS MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA

Los nanotubos de carbono (MWCNTs y NHTS) se dispersan homogéneamente en una serie de disoluciones acuosas de distintos polímeros. Los polímeros ensayados como agentes dispersantes para preparar suspensiones acuosas de CNTs son quitosano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, elastina (EL4BCR, [ver apartado 3.1.1.3.2](#)), gelatina purificada ([ver apartado 3.2.2.2](#)), además de mezclas de gelatina con sulfato de condroitina o ácido hialurónico.

Para comparar los distintos materiales, los *scaffolds* se preparan con la misma concentración de polímero dispersante (1% p/p) y de nanotubos de carbono (6% p/p). Las mezclas permanecen en agitación durante 24 horas en una placa magnética y se someten a una sonicación final de 5 minutos para conseguir la dispersión final. Estas suspensiones se recogen en jeringuillas de insulina y se congelan por inmersión a velocidad constante (5.9 mm/min) en un baño de nitrógeno líquido ([ver apartado 3.2.2.3](#)). Del liofilizado de estas muestras se obtienen monolitos constituidos en su mayor parte por CNTs que conservan la forma cilíndrica de las jeringuillas en las que se preparan. Como se ha mencionado anteriormente se descartan de los *scaffolds* las partes correspondientes a la fase densa y celular. La morfología de estos monolitos 3D se estudia mediante microscopía SEM ([Fig. 7.2, 7.3, 7.4 y 7.5](#)). En las [figuras 7.2 y 7.3](#) se muestran una selección de micrografías SEM de secciones perpendiculares a la dirección de congelado de los *scaffolds* preparados. En todos los casos los monolitos muestran una estructura macroporosa de nanotubos de carbono interconectados, con un patrón regular de poros reconocible a lo largo de toda su estructura interna. El papel de estos polímeros en la construcción de los monolitos pasa de ser inicialmente el agente dispersante de los CNTs en las diversas suspensiones acuosas, a formar parte de los *scaffolds* como el “cemento” que actúa de soporte de la estructura 3D de nanotubos de carbono. Manteniendo constantes las variables que afectan la metodología ISISA, la homegeneidad y el grado de ordenamiento de estas estructuras varían según el tipo de polímero dispersante. La distribución de los nanotubos de manera más o menos homogénea es un reflejo de la mayor o menor homegeneidad de las suspensiones de CNTs en los diferentes polímeros. En particular, se observa que las estructuras más ordenadas

se obtienen a partir de las suspensiones de polisacáridos (CS, HA y Q) mientras que las estructuras de los *scaffolds* preparados a partir de suspensiones de proteínas (G y EL) presentan un patrón de canales menos organizados y unos poros de menor tamaño. Este orden estructural está relacionado con el peso molecular de los polímeros empleados, o sea, con la longitud de las cadenas poliméricas.⁶² La mayor longitud de la cadena polimérica de los polisacáridos induce una mayor repulsión estérica en las dispersiones de los nanotubos y favorece una mejor dispersión de los mismos.⁶³ Así mismo, las características microestructurales observadas en función del peso molecular de los polímeros se pueden atribuir a la mayor o menor capacidad para formar cristales de hielo.⁶⁴

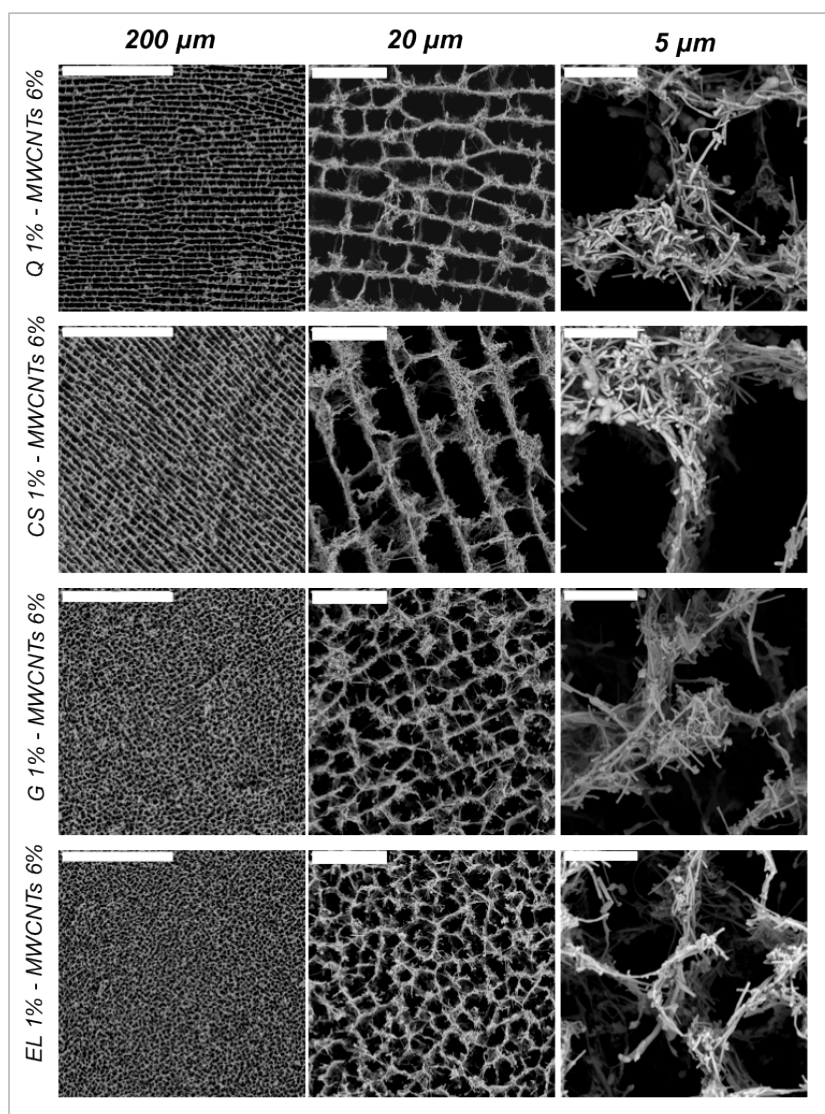


Figura 7.2. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones al 6% (p/p) de MWCNTs en soluciones acuosas de diversos polímeros dispersantes al 1% (p/p). De arriba abajo: quitosano, sulfato de condroitina, gelatina y elastina. De izquierda a derecha, barras de escala de 200 μm , 20 μm y 5 μm , respectivamente.

Hay que tener en cuenta que la disolución de ácido hialurónico al 1% p/p es muy viscosa con respecto a las de los otros polímeros a la misma concentración, debido al elevado peso molecular de este polisacárido. Esta elevada viscosidad complica la correcta dispersión de los nanotubos y la consiguiente preparación de los soportes porosos. Por este motivo, los *scaffolds* de ácido hialurónico se preparan a partir de suspensiones de concentración más baja de polímero (0.3% p/V) (Fig. 7.3).

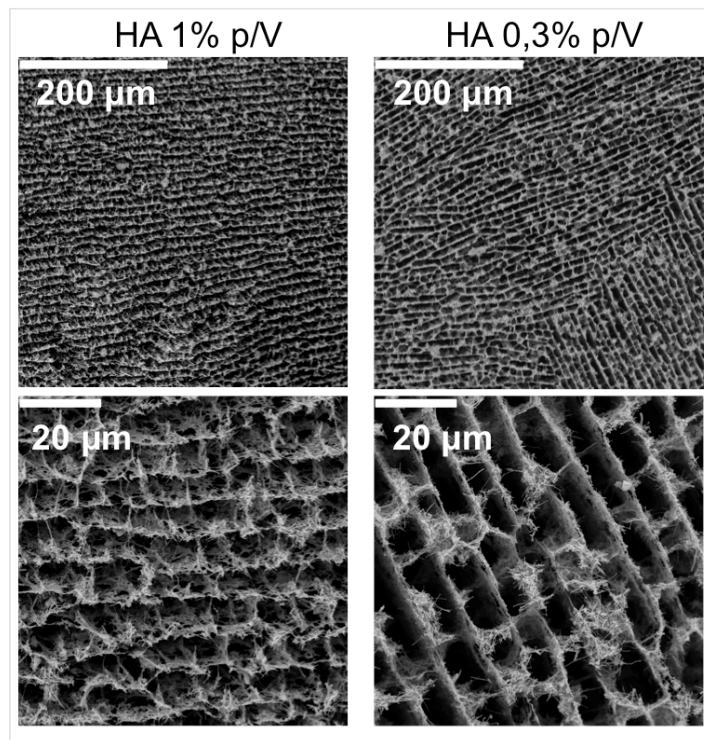


Figura 7.3. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones al 6% (p/V) de MWCNTs en soluciones acuosas de HA al 1% (p/p) y al 0.3% (p/p).

La preparación de *scaffolds* con mezclas de polímeros permite corroborar la importancia que el tipo de polímero (y su peso molecular) tiene en las características estructurales del material resultante, tal y como se observa en las imágenes SEM (Fig. 7.4). En particular, se preparan soportes porosos manteniendo la concentración total de los polímeros dispersantes al 1% p/p, pero usando unas mezclas de gelatina con sulfato de condroitina (CS-G) o ácido hialurónico (HA-G) en proporciones variables. Se observa que la presencia del polisacárido favorece una mayor organización de los canales y que, a medida que aumenta la cantidad de gelatina y disminuye la cantidad de polisacárido (P0.1% - GEL0.9%), las paredes de los poros aparecen menos compactas y más desordenadas. Esto es más evidente en la mezcla ácido hialurónico-gelatina (HA-G), donde la diferencia de peso molecular entre los dos polímeros es mayor.

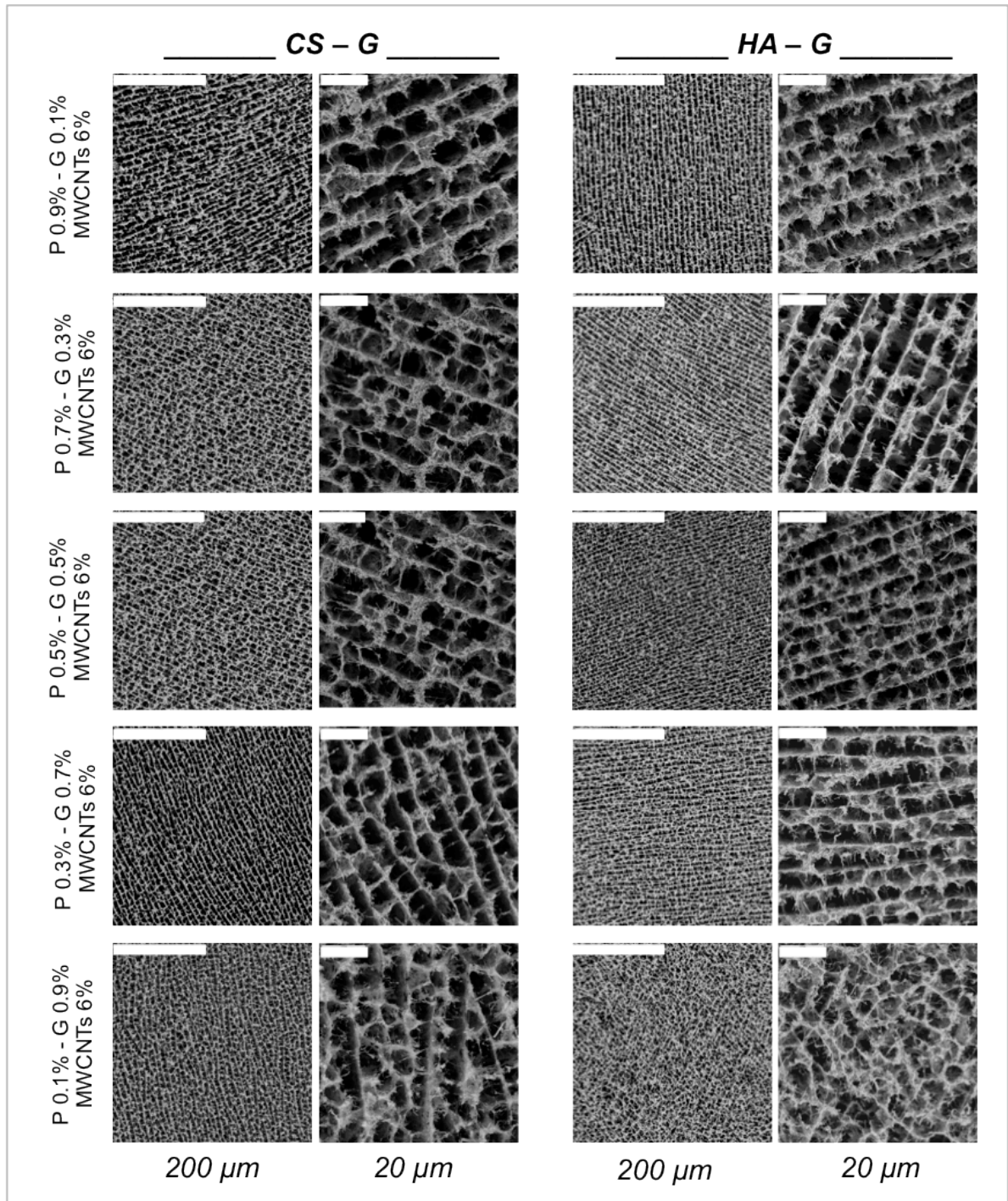


Figura 7.4. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones al 6% (p/p) de MWCNTs en soluciones acuosas de una mezcla de polímeros dispersantes al 1% (p/p). Las dos columnas de la izquierda muestran secciones de *scaffolds* de CS-G y las dos columnas de la derecha de HA-G, en porcentajes variables.

De manera parecida se preparan *scaffolds* con nanotubos de carbono del tipo NHTS. Análogamente a los resultados mostrados anteriormente, en la [figura 7.5](#) se observa que los *scaffolds* de polisacáridos (quitosano y sulfato de condroitina) presentan una estructura más

organizada, con poros de dimensiones más grandes, con respecto a los *scaffolds* preparados con proteínas (gelatina y elastina). Además, se puede apreciar que los soportes de gelatina y elastina con NHTS presentan unos canales más alineados con respecto a sus análogos con MWCNTs. En todos los casos, se pone de manifiesto que la presencia de nanotubos NHTS, más cortos, permite la formación de paredes de canales más gruesas en los canales (ver capítulo 6). Como se menciona en el capítulo anterior, los nanotubos NHTS, de menor longitud, segregan mejor durante el proceso de congelación, dando lugar a cristales más grandes con mayor materia acumulada en sus bordes, además de estructuras más organizadas.

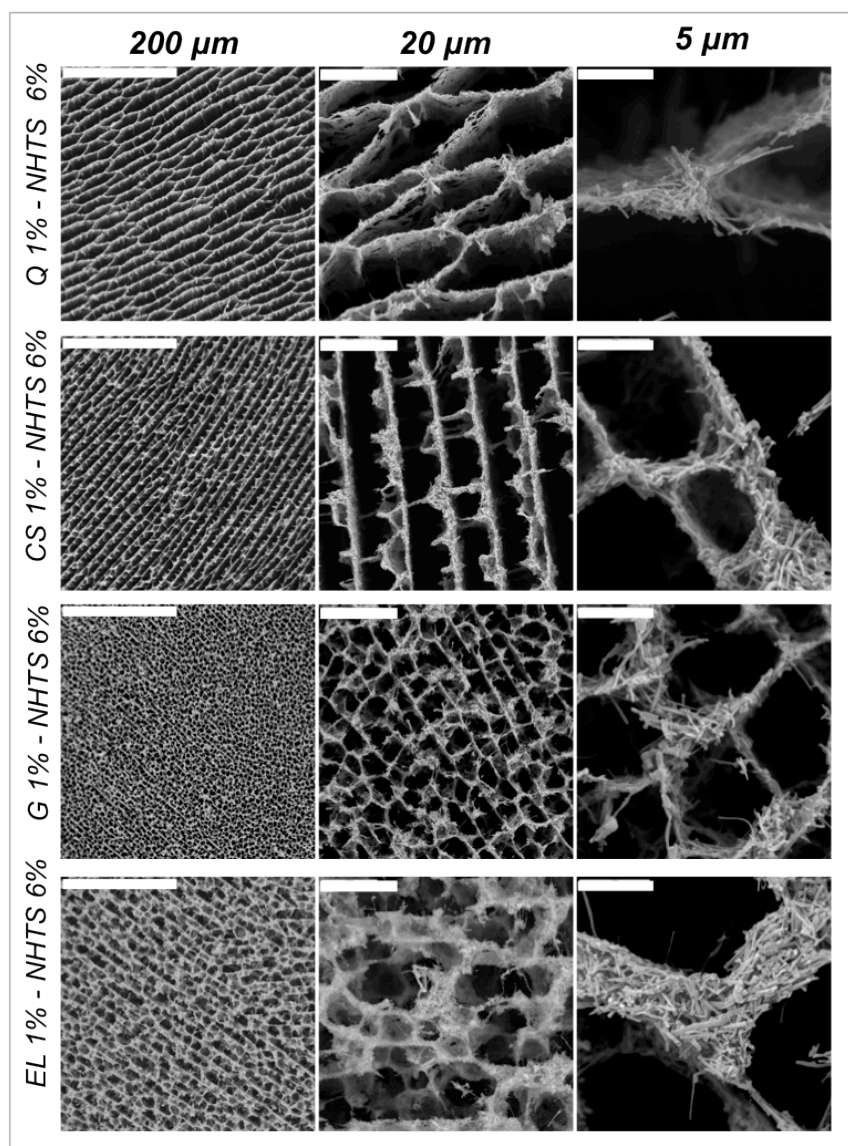


Figura 7.5. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones al 6% (p/p) de NHTS en soluciones acuosas de polímeros dispersantes al 1% (p/p). De arriba a abajo: quitosano, sulfato de condroitina, gelatina y elastina. De izquierda a derecha, barras de escala de 200 μm , 20 μm y 5 μm , respectivamente.

Además de una mayor probabilidad de funcionalización superficial, la menor longitud de los nanotubos de carbono NHTS con respecto a los MWCNTs, posibilita el uso de un agente dispersante con una longitud de cadena polimérica menor para inducir la repulsión estérica necesaria para lograr una dispersión correcta de CNTs. Es decir, los nanotubos de carbono NHTS son más fáciles de dispersar y estabilizar en las dispersiones de los polímeros utilizados en estos estudios.

7.2.2. REFORZAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS SCAFFOLDS

Uno de los requisitos iniciales para el uso de estos materiales como soportes para Ingeniería de tejidos es su estabilidad estructural y mecánica en disolución acuosa. Para satisfacer esta condición fundamental, se refuerza la estructura del *scaffold*, mediante un proceso de entrecruzamiento del polímero, que, para favorecer la biocompatibilidad final, se realiza mediante exposición a vapores de un agente entrecruzante (ver apartado 3.2.2.3.3). En particular, se emplean vapores de glutaraldehído (GA) para los soportes de quitosano (ver apartado 9.2) y de hexametildiisocianato (HMDI) para los demás polímeros (ver apartado 6.4.1). Mediante SEM se comprueba que no hay variaciones significativas en la morfología y estructura de los *scaffolds* después el proceso de entrecruzamiento e hinchamiento en disolución acuosa (Fig. 7.6).

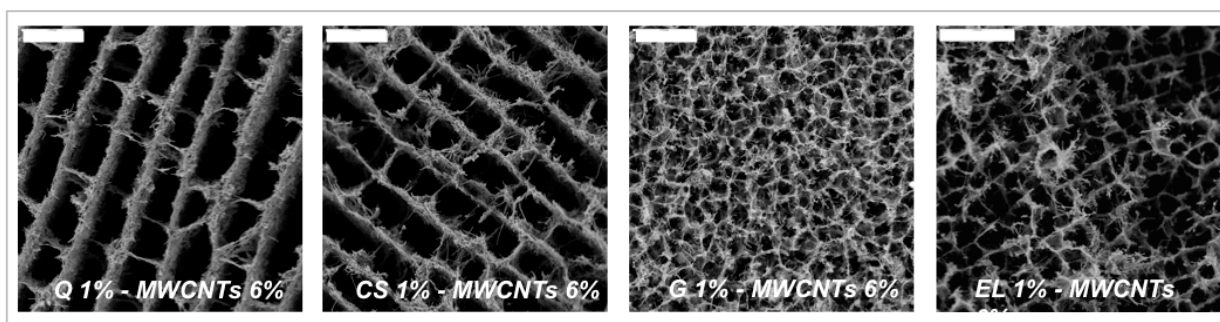


Figura 7.6. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* entrecruzados preparados a partir de suspensiones al 6% (p/p) de MWCNTs en soluciones acuosas de polímeros dispersantes al 1% (p/p). De izquierda a derecha: quitosano, sulfato de condroitina, gelatina y elastina. Barras de escala de 20 μm .

En la figura 7.7 se puede observar que, efectivamente, el reforzamiento de las matrices con el correspondiente agente entrecruzante es fundamental para mantener la estructura del *scaffold*. Como era de esperar, el único *scaffold* no entrecruzado que conserva perfectamente su estructura en disolución acuosa neutra (PBS a pH=7.4, 37°C) es el de quitosano (Fig. 7.7-Q).

Obviamente, este fenómeno se debe a la insolubilidad del quitosano en disolución acuosa neutra, lo que permite mantener la estabilidad de la matriz en dichas condiciones.

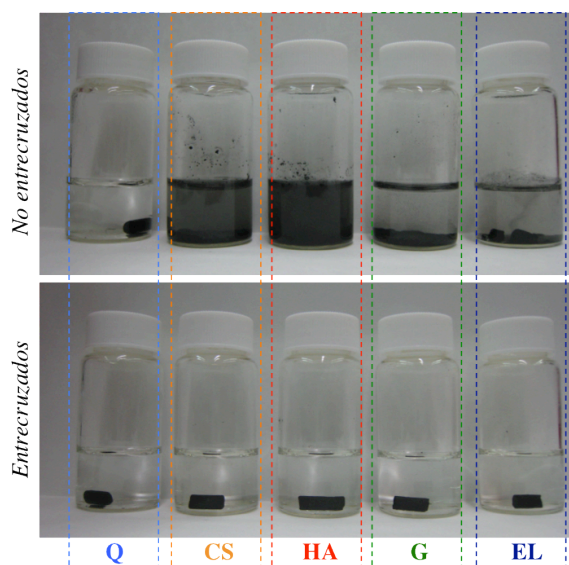


Figura 7.7. Imágenes de *scaffolds* de MWCNTs y distintos polímeros (quitosano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, gelatina, elastina), entrecruzados y no entrecruzados, mantenidos en PBS (pH=7.4) durante 1 semana a 37°C.

En la [figura 7.7](#) se observa también que el *scaffold* de elastina (EL) no entrecruzado, en disolución de PBS a 37°C, mantiene parcialmente su estructura. En este caso particular, el resultado depende de la temperatura de transición (T_t) de la elastina EL4BCR, por encima de la cual el polímero se vuelve insoluble ([ver apartado 3.1.1.3.2](#)) y permite que el *scaffold* no se desintegre por completo. Esta conclusión se obtiene gracias a estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC), donde se investiga el comportamiento térmico de disoluciones acuosas de elastina y en presencia o ausencia de nanotubos de carbono MWCNTs. En ambos casos, el valor de T_t de EL4BCR se mantiene inferior a 37 °C ([Tabla 7.1](#)), permitiendo así que el *scaffolds* no se disuelva completamente en disolución acuosa a dicha temperatura. El signo negativo de los valores de entalpía indica que se trata de un proceso exotérmico.

Tabla 7.1. Valores de T_t y ΔH para los polímeros de elastina EL4BCR, obtenidos mediante análisis DSC.

Elastina		T_t (°C)	ΔH (J/g)
EL4BCR	EL 1% p/V en H ₂ O	16.2	-11.3
	EL 1% p/V en H ₂ O con MWCNTs 6% p/V	18.3	-7.8

Hay que tener en cuenta que en estudios preliminares, se habían preparado *scaffolds* con dos elastinas sintéticas diferentes: EL4bCR y EL2bCR. Estos dos tipo de polímeros de bloque comparten una similar composición de aminoácidos, con una secuencia distribuida en bloques que se traduce en un mayor peso molecular para el polímero tetrabloque EL4bCR que para el dibloque EL2bCR. Mientras estas diferencias no influyen significativamente en la morfología del *scaffold* (Fig. 7.8), sí se observa una importante diferencia en la resistencia mecánica de la matriz. En la figura 7.8 se muestra cómo los *scaffolds* preparados con EL2bCR, de menor peso molecular, no pueden entrecruzarse satisfactoriamente, lo que conlleva a la consiguiente desintegración de la matriz en disolución acuosa. En consecuencia, el uso de los *scaffolds* de EL2bCR como soportes celulares no fue posible, y los estudios posteriores incluidos en esta tesis han sido realizados con elastina EL4bCR.

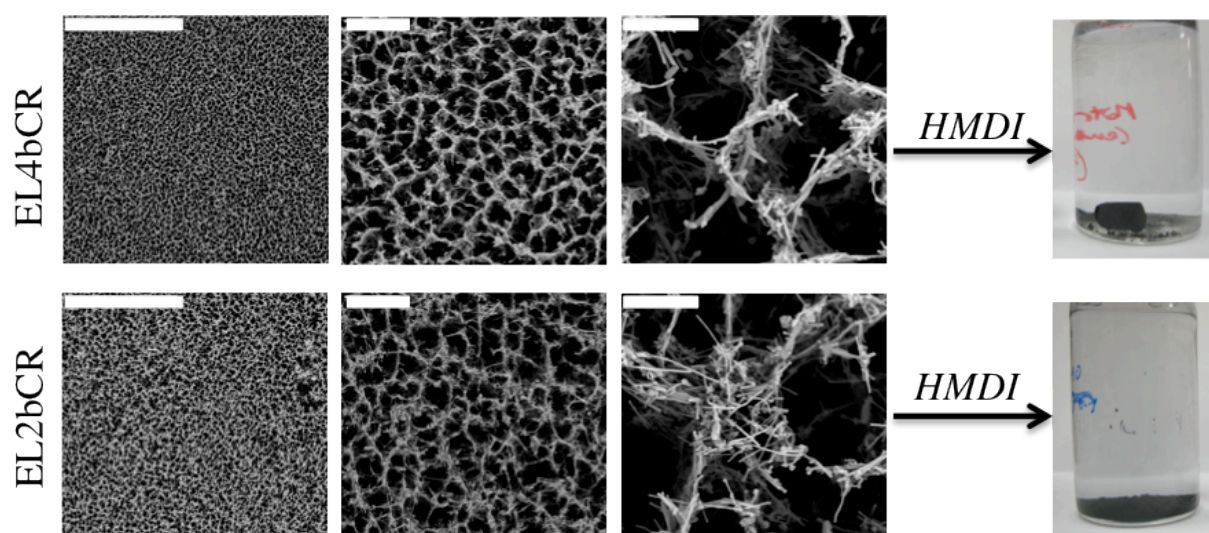


Figura 7.8. A la izquierda, micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* de EL (EL2bCR y EL4bCR) con MWCNTs 6% (p/p) (de izquierda a derecha, barras de escala de 200, 20 y 5 μm). A la derecha *scaffolds* de las correspondientes elastinas en disolución acuosa (PBS a pH=7.4) después entrecruzamiento con HMDI (durante 1 semana).

7.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS

En este apartado, se incluye la caracterización físico-química de todas las matrices presentadas anteriormente, con especial interés en el efecto del tipo de polímero empleado sobre las propiedades de los materiales resultantes.

7.2.3.1. Análisis termogravimétrico

Como se ha descrito anteriormente, el análisis termogravimétrico (TGA) consiste en medir los cambios de masa de una muestra sometida a un programa de calentamiento progresivo ([ver apartado 3.2.2.5.4](#)). Estas pérdidas de masa se utilizan para calcular o aproximar la cantidad de fase del material que se descompone y, de esta manera, conocer su estabilidad térmica.

Todos los termogramas de los *scaffolds* analizados ([Fig. 7.9](#)) presentan un único proceso de degradación térmica. En el caso del quitosano ([Fig. 7.9-B](#)), antes de la descomposición térmica del polímero se observa una etapa preliminar que se puede asignar a la pérdida de agua (o restos de ácido procedentes de la disolución de partida). Como era de esperar, los *scaffolds* presentan el mismo porcentaje de masa residual ($\approx 85\%$) a la temperatura de 600 °C. El valor experimental de la masa residual se corresponde al porcentaje de nanotubos de carbono en los *scaffolds*.

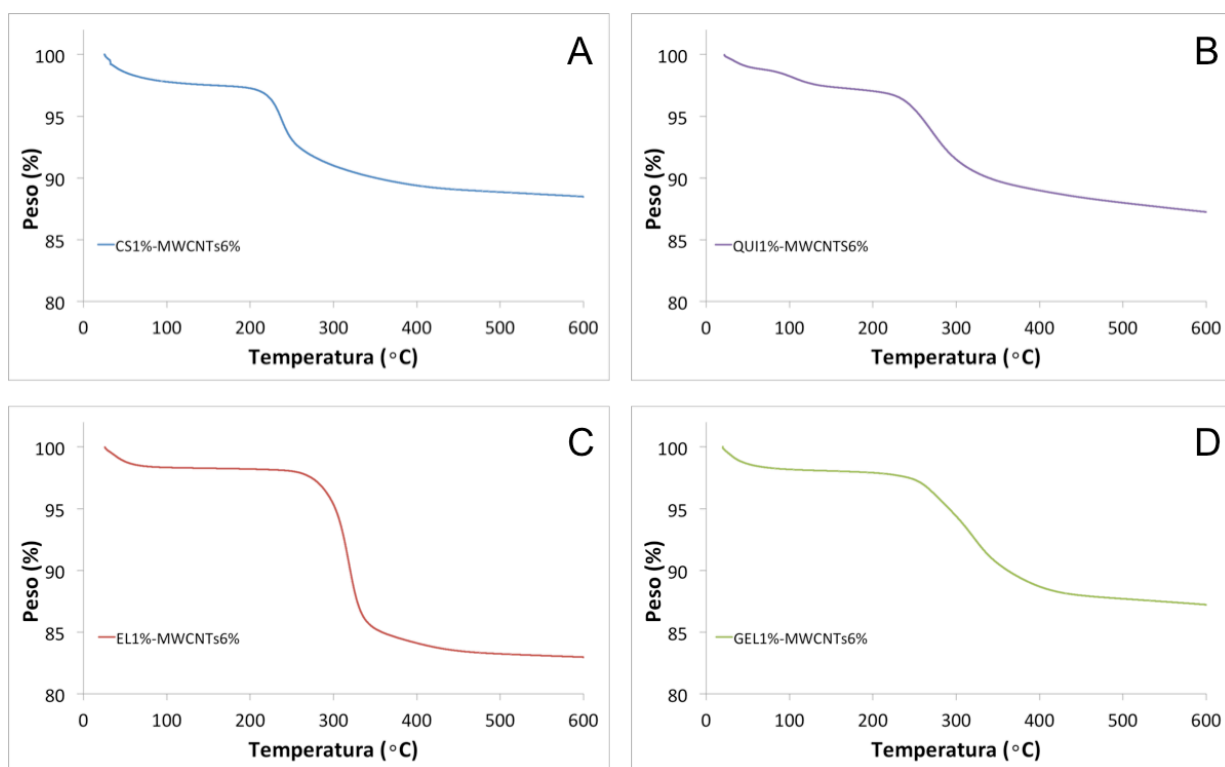


Figura 7.9. Termogramas (TGA) de muestras de *scaffolds* de MWCNTs 6% p/p con diferentes polímeros (sulfato de condroitina, A; quitosano, B; elastina, C; gelatina, D) al 1%p/p.

En la [figura 7.10](#) se comparan las curvas termogravimétricas para los *scaffolds* de sulfato de condroitina, gelatina y de la mezcla de estos dos polímeros. Se observa cómo el proceso de degradación térmica para el *scaffold* [(CS0.5-G0.5)W6] presenta un perfil intermedio entre los

de los soportes formados por cada uno de los polímeros por separado. La degradación térmica de estas muestras sucede, muy probablemente, mediante un proceso en dos etapas, una primera degradación correspondiente a CS y una segunda correspondiente a G.

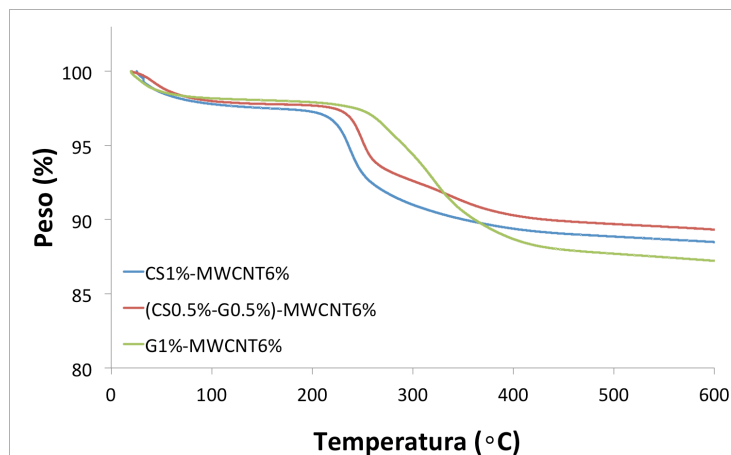


Figura 7.10. Termogramas (TGA) de muestras de *scaffolds* de MWCNTs 6% con diferentes polímeros: CS 1% (azul); CS0.5%-G0.5% (rojo); G1% (verde).

El estudio termogravimétrico no se repite con las matrices que contienen NHTS en lugar de MWCNTs porque, como se ha indicado en el capítulo anterior, la presencia de estos nanotubos no modifica el perfil general del proceso de degradación de los *scaffolds* (ver apartado 6.4.3).

7.2.3.2. Pruebas mecánicas: ensayos de flexión en tres puntos

Como se ha indicado anteriormente, el uso de *scaffolds* en Ingeniería de tejidos exige el mantenimiento de la integridad estructural de los soportes, tanto durante su manipulación como durante su posterior interacción como sistemas biológicos. Debe ser, por tanto, posible manejar con facilidad los *scaffolds*, sin que se rompan o se modifiquen estructuralmente, soportando una carga mecánica modesta durante el cultivo celular.⁶⁵

Mediante un ensayo de flexión en tres puntos, se evalúa la resistencia a la flexión de los materiales entrecruzados. Según los datos mostrados en la [tabla 7.2](#), los *scaffolds* de CS y G presentan una modesta disminución del módulo de Young cuando se pasa de soportes preparados con nanotubos MWCNTs a NHTS. La funcionalización de los nanotubos hace que los NHTS obtenidos, al ser más cortos, establezcan un menor número de puntos de contacto entre sí y dificulten la formación de una “red continua” de nanotubos en el *scaffold*. En consecuencia, los valores del módulo de Young disminuyen. En el caso de los *scaffolds* de

gelatina, el aumento del módulo de Young con los NHTS se puede explicar considerando una distribución más homogénea de estos nanotubos en la matriz, por su mejor dispersión inicial, que conlleva a la formación de una estructura de canales más ordenada y reforzada.

Tabla 7.2. Valores del módulo de Young (E^*) para distintos *scaffolds* construidos con diferentes polímeros y CNTs. Todos los *scaffolds* se preparan en las mismas condiciones, con las mismas concentraciones de polímero/CNTs y se refuerzan con el correspondiente agente entrecruzante. Valores expresados en MPa.

	MWCNTs 6%	NHTS 6%
Q 1%	5.2	4.0
CS 1%	7.0	5.3
G 1%	8.4	12.1

La variación del módulo de Young se mide también en aquellos *scaffolds* preparados con mezclas de dos polímeros (i.e. gelatina y sulfato de condroitina) (Fig 7.11). En particular, se hacen experimentos con concentraciones totales de polímeros de 1% y 2% (p/p), variando las proporciones de CS y G. Cuando la concentración total de polímeros dispersantes es del 1%, la modificación de las proporciones de sulfato de condroitina respecto a gelatina no induce cambios significativos en las propiedades mecánicas de los *scaffolds*. De forma diferente, cuando la concentración total sube al 2% p/p, se observa un aumento general del módulo de Young. Esto es debido a que los valores de densidad relativa del *scaffold* y el valor del módulo de Young están relacionados. Así, a mayor contenido de material incorporado en el mismo volumen, y por tanto, mayor densidad relativa, mejoran las propiedades mecánicas del material resultante.⁶⁶ También, puede observarse que el aumento de la proporción de gelatina con respecto al sulfato de condroitina induce también un aumento del módulo de Young, llegando a un máximo en el *scaffold* [(CS0.6-G1.4)W6H]. En este caso, la presencia de una mayor cantidad de gelatina aporta un mayor número de grupos carboxílicos, que permitirán alcanzar un mayor grado de entrecruzamiento y, en consecuencia, incrementar el módulo de Young. La disminución posterior del módulo de Young en proporciones de G superiores a 1.4% p/p, valor máximo registrado, está probablemente relacionada con el empeoramiento de la homogeneidad de los MWCNTs en la matriz y por tanto, de la estructura del *scaffold* resultante.

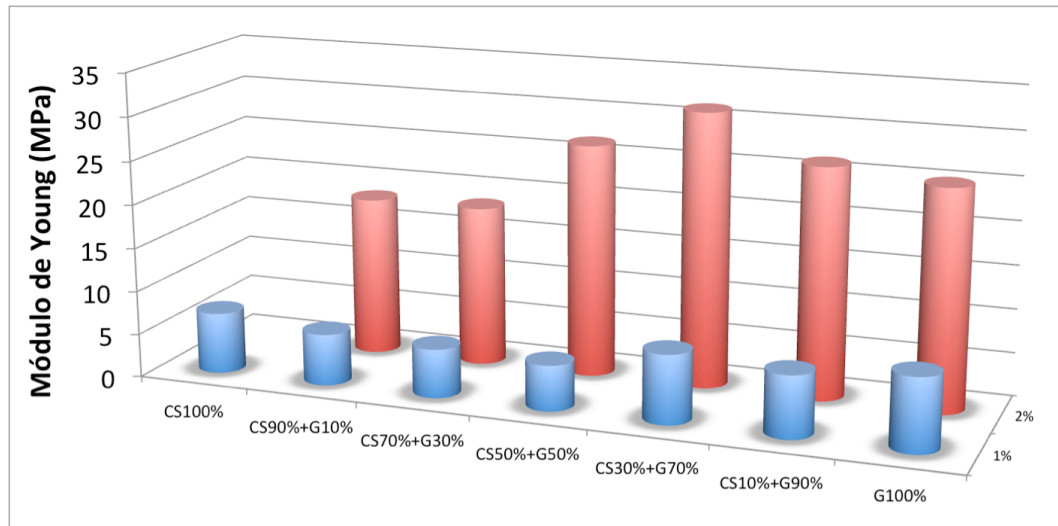


Fig 7.11. Valores del módulo de Young para distintos *scaffolds* contruidos con MWCNTs y una mezcla de dos polímeros (CS y G) al 1% (azul) y al 2% (rojo), en proporciones variables uno respecto del otro. Todos los *scaffolds* se preparan en las mismas condiciones, con una concentración total de polímero del 1% ó 2% (p/p) y MWCNTs al 6%p/p, y reforzados con HMDI como agente entrecruzante. Los valores indicados se expresan en MPa.

Adicionalmente, se comparan los resultados obtenidos para *scaffolds* preparados con mezclas de ácido hialurónico y gelatina, o de sulfato de condroitina y gelatina, manteniendo la concentración total de polímero dispersante al 1% p/p (Fig. 7.12). La presencia de HA (de elevado peso molecular) hace que los soportes resultantes presenten valores mayores para el módulo de Young, con variaciones similares a los resultados expuestos anteriormente (Fig. 7.11).

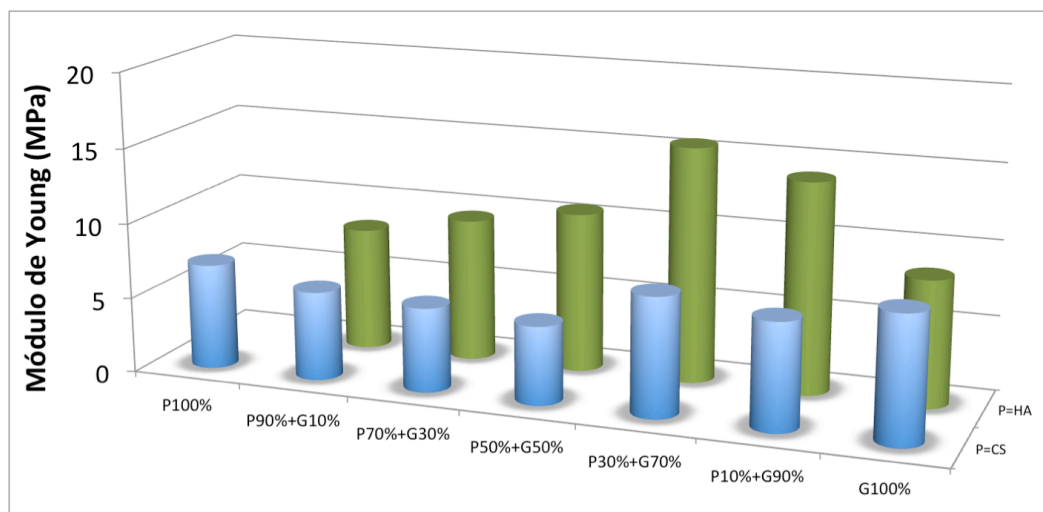


Fig 7.12. Valores del módulo de Young para distintos *scaffolds* contruidos con MWCNTs y mezcla de dos polímeros (P: CS-G, azul; HA-G, verde), en proporciones variables uno respecto al otro. Todos los *scaffolds* estan reforzados con HMDI y se preparan en las mismas condiciones, con una concentración total de polímero del 1% (p/p) y MWCNTs al 6%p/p. Los valores indicados se expresan en MPa.

7.2.3.3. Determinación de la conductividad

Las propiedades eléctricas de los biomateriales pueden ser extremadamente interesantes si el *scaffold* se emplea para estimular y modular el crecimiento celular, especialmente para células de tejido muscular y nervioso. En tal caso, la presencia de los nanotubos permite la fabricación de materiales conductores.⁶⁷ Usando un método clásico de cuatro puntas, se mide la conductividad a través de varios *scaffolds* preparados con distintos polímeros y nanotubos (ver apartado 3.2.2.5.2). Para poder comparar los resultados, todas las muestras se preparan con el mismo tamaño, la misma forma cilíndrica y el mismo área transversal. En todos los casos, las medidas de conductividad se realizan sobre matrices entrecruzadas y se calculan por unidad de longitud del *scaffold*. En la [tabla 7.3](#) se muestran los valores de conductividad obtenidos para los distintos tipos de soportes. Se observa que la conductividad de los *scaffolds* preparados con polisacáridos (quitosano y sulfato de condroitina) es mayor de la que se obtiene con los preparados con las proteínas (elastina y gelatina). Esta diferencia puede radicar en la diferente morfología de los dos tipos de soportes (ver párrafo 7.2.1). En concreto, los *scaffolds* de CS o QUI presentan una estructura más ordenada con formación de canales homogéneamente distribuidos, lo que favorece el contacto entre los nanotubos y permite obtener valores mayores de conductividad. Por otro lado, se observa también que los soportes preparados con nanotubos del tipo MWCNTs presentan una mayor conductividad con respecto a los preparados con NHTS. La conectividad de los nanotubos cortos (NHTS), por su menor relación de aspecto, resulta, por lo tanto, menor e, inevitablemente, comporta una menor conductividad en el *scaffold* resultante. Esta disminución de la conductividad llega a ser tan drástica que, en el caso de las matrices preparadas con elastina y gelatina, la resistencia del *scaffold* es tan elevada que no se consigue medir un valor de conductividad.

Tabla 7.3. Valores de conductividad obtenidos para distintos *scaffolds* contruidos con diferentes polímeros y CNTs. Todos los *scaffolds* se preparan en las mismas condiciones, con las mismas concentraciones de polímero/ CNTs y se refuerzan con el correspondiente agente entrecruzante. Los valores de conductividad aparecen expresados en $S \cdot cm^{-1}$.

	MWCNTs 6%	NHTS 6%
Q 1%	1.70	0.32
CS 1%	1.44	0.13
G 1%	0.19	---
EL 1%	0.04	---

También se estudia la variación de la conductividad en las matrices formadas por mezcla de dos polímeros (G y CS). En este caso, parece haber una relación inversamente proporcional entre el contenido en gelatina y el valor de conductividad de la matriz resultante (Fig. 7.13). Este resultado confirma que la variación morfológica del *scaffold* determina un menor contacto entre los nanotubos que contienen gelatina, con una inevitable caída de la conductividad. Aumentando la cantidad de agente dispersante, del 1% y al 2% p/p, el comportamiento de la conductividad se modifica (Fig. 7.13). Así, en *scaffolds* con mayores proporciones de sulfato de condroitina, el aumento de la cantidad de biopolímero en la dispersión inicial favorece una mejor dispersión de los CNTs, por su baja viscosidad, lo que se traduce en un mayor contacto entre nanotubos y, en consecuencia, en un aumento de la conductividad. Por el contrario, el aumento del contenido de gelatina determina una peor dispersión de los MWCNTs y una consiguiente disminución de los valores de conductividad.

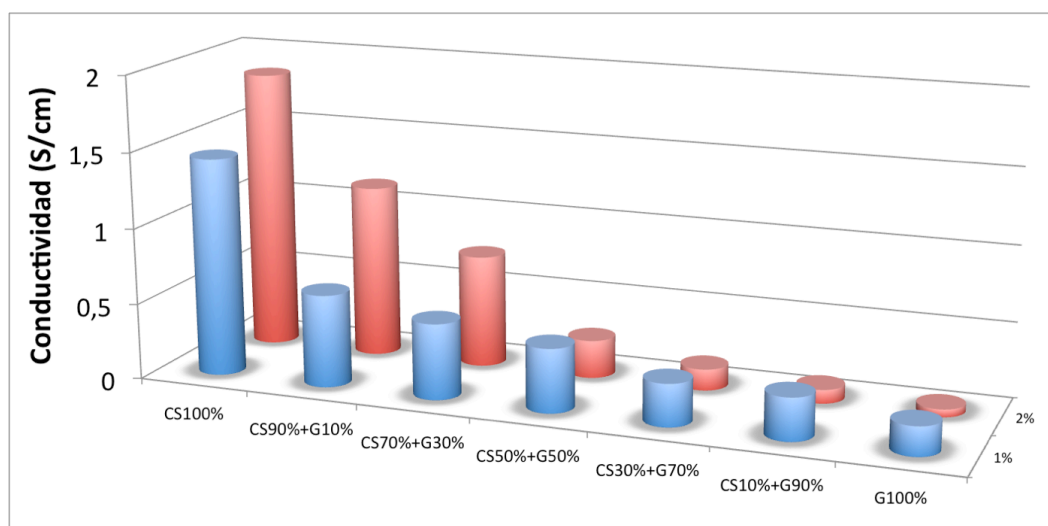


Fig 7.13. Valores de conductividad obtenidos para distintos *scaffolds* contruidos con una mezcla de dos polímeros (CS y G) al 1% (azul) y al 2% (rojo), en proporciones variables uno respecto al otro. Todos los *scaffolds* se preparan en las mismas condiciones, con las mismas concentraciones de CNTs y se refuerzan mediante entrecruzamiento con HMDI. Los valores de conductividad se expresan en $S \cdot cm^{-1}$.

7.3. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO*

Dada la aplicabilidad en Ingeniería de tejidos de los *scaffolds* poliméricos de CNTs anteriormente descritos, el último paso en su caracterización de estos soportes comprende la evaluación de su biocompatibilidad *in vitro*. En estos estudios se han empleado tres tipos distintos de células de mamífero: fibroblastos L929 de ratón, osteoblastos humanos Saos-2 y

células progenitoras de endotelio obtenidas a partir de muestras de sangre de cerdo (EC_{PC}). La selección de estos tipos celulares permite evaluar la interacción célula-biomaterial en base a tres criterios diferentes: especie animal de origen, tamaño celular y patrón de adhesión al soporte.

En primer lugar, se analiza la interacción de los *scaffolds* con fibroblastos L929, una línea celular ampliamente utilizada para estudios preliminares de biocompatibilidad *in vitro*.⁶⁸ Estas células se consideran células de movimiento lento y muestran en cultivo una característica morfología fusiforme (Fig. 7.14-A/B). A continuación, se estudia el comportamiento de las células progenitoras de endotelio (células EC_{PC}) en contacto con los *scaffolds*, dado el interés que ha suscitado la mayor susceptibilidad de ciertos tipos de células progenitoras al daño inducido por nanotubos de carbono.⁶⁹ Además, el patrón de adhesión celular en este caso es diferente, ya que, en términos generales, las células EC_{PC} tienden a extenderse más ampliamente sobre la superficie del soporte durante el proceso de adhesión, en un intento por imitar el recubrimiento de la cara luminal de los vasos sanguíneos (capa íntima de endotelio vascular) (Fig. 7.14-E/F). Finalmente, se eligen los osteoblastos Saos-2 (Fig. 7.14-C/D) como un tipo de células maduras, con un tamaño celular y un patrón de adhesión intermedio entre los fibroblastos y las células EC_{PC}. Estas células permiten, además, hacer una evaluación preliminar del comportamiento de un tipo celular específico de células humanas (i.e. células de tejido óseo) en contacto con estos biomateriales.

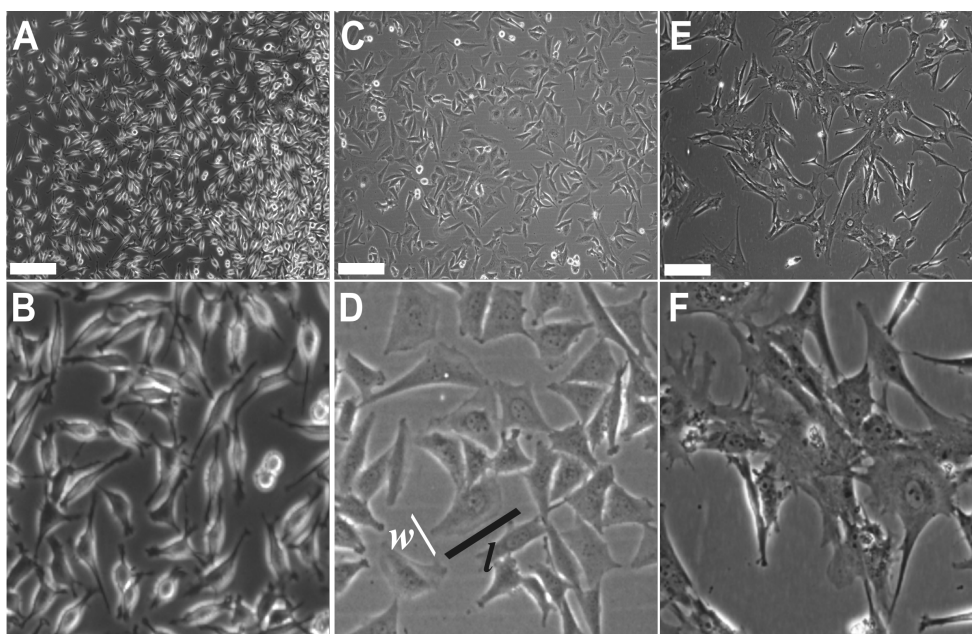


Figura 7.14. Imágenes de microscopía óptica con contraste de fases de fibroblastos L929 (A-B), osteoblastos Saos-2 (C-D) y células EC_{PC} (E-F) después de 24 horas en cultivo sobre placas de poliestireno estándar para cultivo celular. Las barras de escala representan 20 μ m en todas las imágenes.

En la [tabla 7.4](#) se resumen las dimensiones de los diferentes tipos de células utilizadas en este estudio. Como se ha indicado anteriormente, las células EC_{PC} en cultivo presentan una longitud y un anchura, y en consecuencia, un tamaño celular, significativamente mayor que las otras dos. Por el contrario, los fibroblastos L929 muestran una morfología más alargada ($L/W = 4.2$ frente a 3.2 de las células EC_{PC}), mientras que los osteoblastos Saos-2 presentan una morfología más cuadrangular ($L/W = 2.9$). Después del tratamiento con tripsina, necesario para la obtención de las suspensiones celulares de siembra, no se encuentran diferencias significativas entre los diferentes tipos de células, lo que indica una capacidad similar de los tres tipos celulares para penetrar y/o colonizar los *scaffolds* en las primeras etapas de la adhesión celular.

Tabla 7.4. Comparación del tamaño celular de los diferentes tipos de células utilizados en estos estudios.

	Fibroblastos L929	Osteoblastos Saos-2	Células EC _{PC}
<i>Células adheridas en el cultivo</i>			
Longitud (μm)	16.0 ± 3.9	13.5 ± 4.0	$24.6 \pm 7.1^{***}$
Anchura (μm)	3.8 ± 0.9	4.7 ± 1.4	$7.6 \pm 2.4^{***}$
L/W	4.2	2.9	3.2
<i>Células en suspensión</i>			
Diámetro (μm)	5.2 ± 0.7	4.7 ± 0.8	$5.5 \pm 1.0^{***}$

L/W corresponde al cociente longitud/anchura. Análisis estadístico realizado mediante test de ANOVA seguido por las pruebas *post hoc* de Scheffé o Games-Howell dependiendo de la homogeneidad o no de las varianzas, respectivamente. En todos los análisis, valores de $p < 0.005$ (***) se consideran estadísticamente significativos.

Para poder comparar los resultados, todos los estudios celulares *in vitro* se llevan a cabo sobre *scaffolds* preparados manteniendo constante la cantidad de polímero dispersante (1% p/p) y de nanotubos de carbono (6% p/p), con la única excepción de los soportes de ácido hialurónico, en los que la concentración de HA empleada para la preparación de los *scaffolds* es de 0.3% p/p.

7.3.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Se investiga la viabilidad celular mediante el marcaje celular simultáneo con dos sondas fluorescentes diferentes, calceína y de homodímero de etidio-1, y su posterior visualización

mediante microscopía confocal. Como resultado del marcaje, las células viables emiten fluorescencia verde debido a la interacción de la calceína con las esterasas intracelulares, mientras que las células muertas quedan marcadas en rojo por la incorporación del homodímero de etidio-1 en la doble hélice del ADN.

Estudios preliminares con fibroblastos L929 muestran que, en todos los *scaffolds*, los cultivos conservan una alta viabilidad (Fig. 7.15 y Tabla 7.5), a excepción de las matrices de gelatina (Fig. 7.15-E), en las que el porcentaje de muerte celular es significativamente superior.

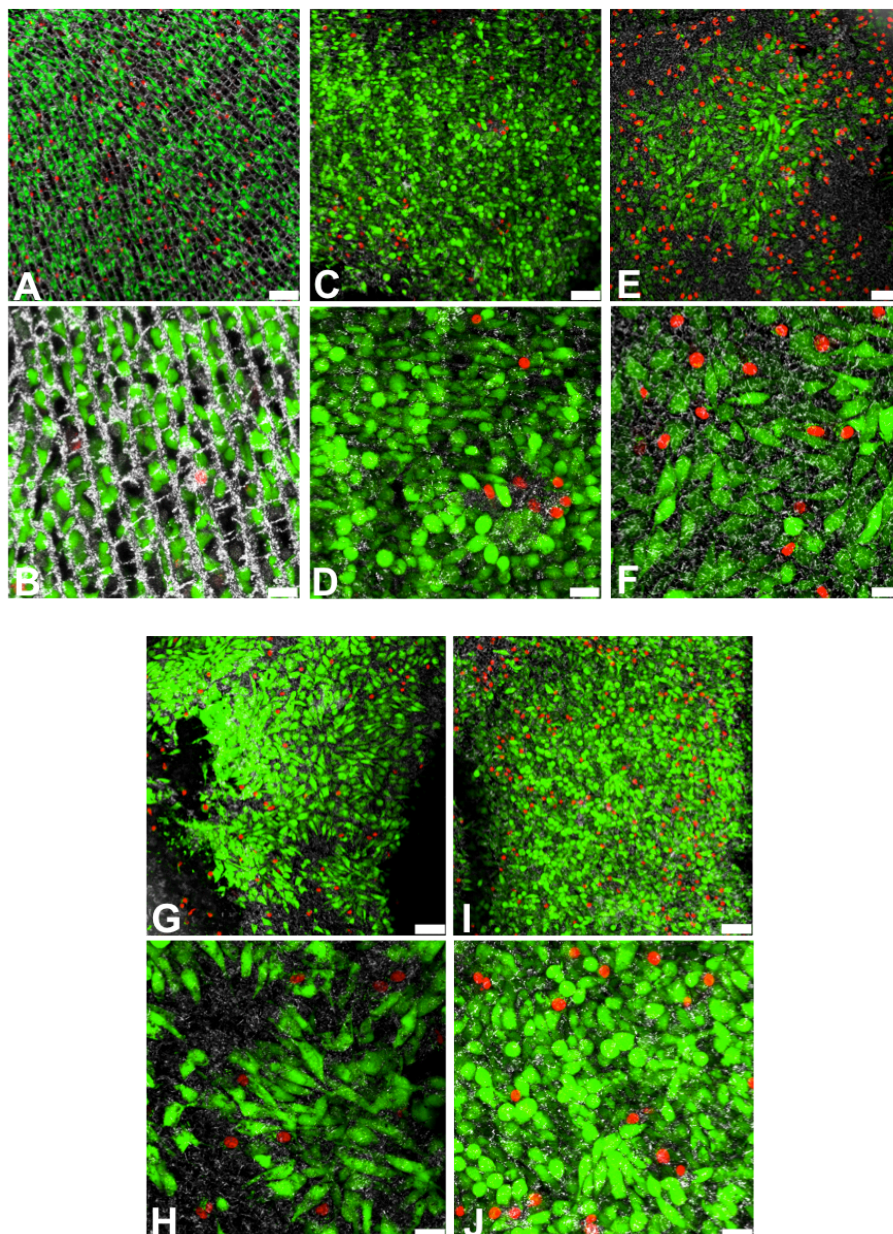


Figure 7.15. Estudios de viabilidad celular con fibroblastos L929 en cultivo sobre matrices de MWCNTs 6% p/p y distintos polímeros: quitosano 1% p/p (A,B), sulfato de condroitina 1% p/p (C,D), gelatina 1% p/p (E,F), elastina 1% p/p (G,H) y ácido hialurónico 0.3% p/p (I,J). Las barras de escala representan: 75 μ m (A,C,E,G,I) ó 25 μ m (B,D,F,H,J).

A continuación, se evalúa la viabilidad celular de osteoblastos Saos-2 y células EC_{PC} sobre *scaffolds* de quitosano, sulfato de condroitina y gelatina. Se excluyen de estos estudios los soportes de ácido hialurónico, por presentar una concentración diferente de polímero con respecto a los demás (0.3% frente al 1% p/p del resto) y los de elastina, por resultar muy frágiles mecánicamente. Esto impide su correcta manipulación durante los pasos establecidos para el cultivo celular. Como se puede apreciar en las imágenes (Fig. 7.16), ambos tipos celulares presentan una alta viabilidad en cultivo sobre los *scaffolds* de quitosano y sulfato de condroitina, siendo ésta significativamente superior en los cultivos de Saos-2.

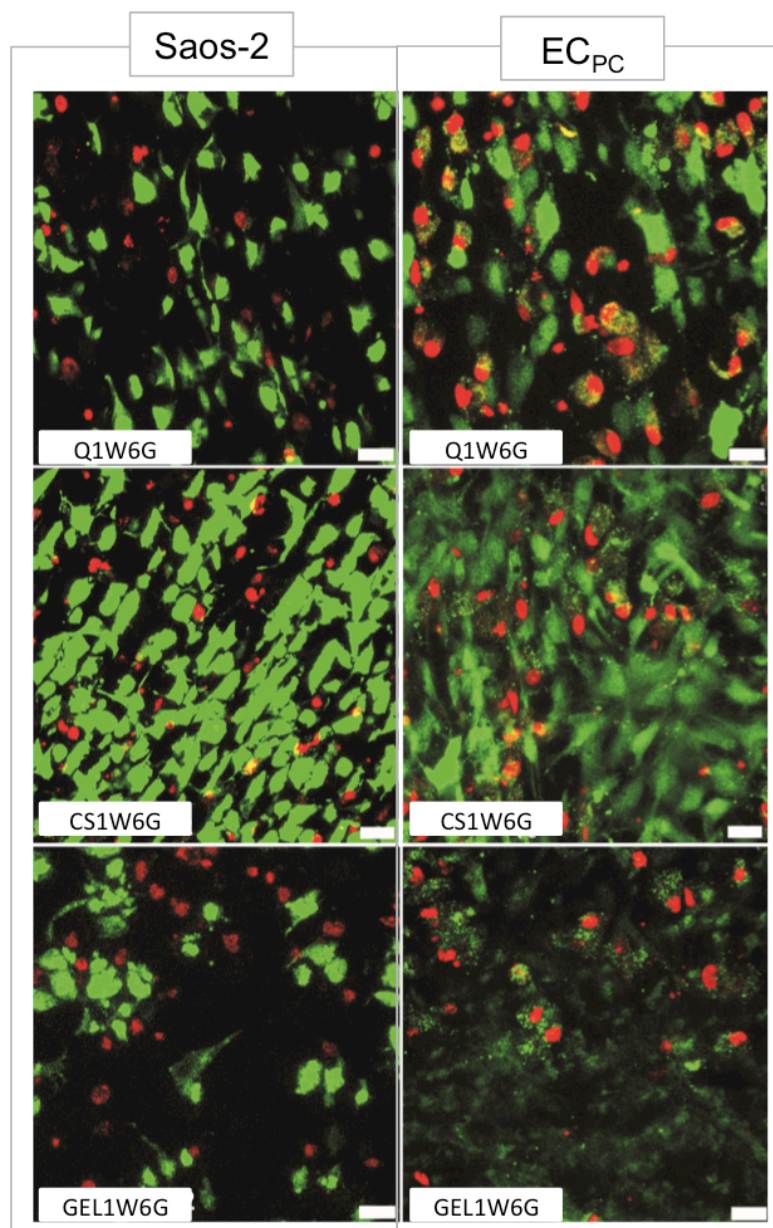


Figura 7.16. Estudios de viabilidad celular a 48h de osteoblastos Saos-2 y células EC_{PC} en *scaffolds* de MWCNTs con diferentes tipos de biopolímeros (Q, CS y G). Las barras de escala en las imágenes representan 25 μ m.

La alta viabilidad de este tipo de osteoblastos ha sido previamente demostrada con otros tipos de materiales con nanotubos de carbono.⁷⁰ Curiosamente, el porcentaje de células con doble fluorescencia (verde y roja), probablemente atribuida a células en proceso de apoptosis, es significativamente más alto en cultivos de células EC_{PC}. Este fenómeno puede ser consecuencia directa del patrón de adhesión más extendido de este tipo celular, que aumenta así la posibilidad de daño celular causado por los extremos de MWCNTs que sobresalen en la superficie del soporte. Este fenómeno resulta dramáticamente más evidente en los cultivos de estas células sobre *scaffolds* de gelatina, en los que apenas sí existen células viables a las 48h. De manera similar, la viabilidad de los cultivos de osteoblastos Saos-2 sobre los *scaffolds* de quitosano y sulfato de condroitina resulta significativamente superior a la encontrada en los cultivos sobre las matrices de gelatina.

Como resumen, las importantes diferencias en la viabilidad celular de los diferentes sustratos se atribuyen, fundamentalmente, a: (1) la presencia de extremos afilados de nanotubos de carbono que quedan accesibles en la superficie del *scaffold* y (2) al patrón de adhesión característico de los distintos tipos celulares. Como se observa en los resultados, la combinación de *scaffolds* con un número significativamente mayor de extremos afilados de CNTs (i.e. soportes de gelatina) y de células con patrones de adhesión más extendidos (como las células EC_{PC}) induce efectos dramáticos en la viabilidad celular de los cultivos.

Aceptando como válida la hipótesis de los extremos afilados de CNTs como responsable parcial de la reducción en viabilidad celular sobre los *scaffolds*, se realizan estudios de viabilidad celular con *scaffolds* preparados con nanotubos NHTS, más cortos y de extremos más redondeados, que permiten formar soportes porosos con paredes más gruesas y menor cantidad de extremos afilados de CNTs con extremos que sobresalen ([ver capítulo 6](#)). En el caso particular de cultivos de osteoblastos Saos-2 sobre *scaffolds* de quitosano, el uso de nanotubos NHTS no supone una mejora significativa de la viabilidad celular, ya de por sí elevada sobre soportes con MWCNTs. Sin embargo, los experimentos con células EC_{PC} cultivadas sobre soportes con NHTS revelan un aumento significativo de la viabilidad celular, junto con una reducción del número de células apoptóticas y necróticas ([Fig. 7.17](#) y [Tabla 7.5](#)).

Así mismo, los cultivos de células EC_{PC} alcanzan una alta viabilidad sobre los *scaffolds* de sulfato de condroitina con nanotubos NHTS ([Fig. 7.18-7.19](#)). En el caso de los *scaffolds* de gelatina con NHTS ([Fig. 7.19](#)), aún cuando se observa una clara mejora en la viabilidad celular respecto al uso de MWCNTs, los porcentajes de células viables son todavía muy bajos para poder considerar estos soportes óptimos para su uso en Ingeniería de tejidos.

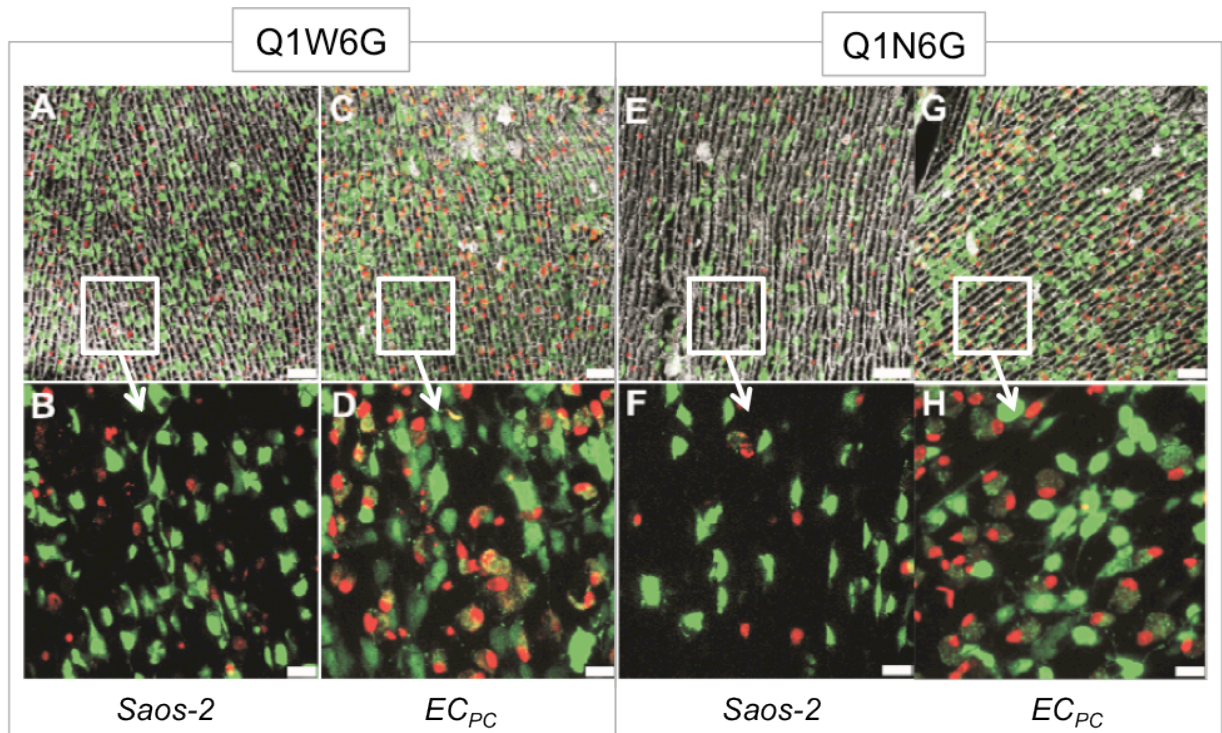


Figura 7.17. Viabilidad celular sobre *scaffolds* de quitosano con nanotubos MWCNTs (A-D) y NHTS (E-H). Se muestran imágenes de microscopía confocal representativas de cultivos de osteoblastos Saos-2 (A-B, E-F) y de células EC_{PC} (C-D, G-H) a 48h. Las barras de escala representan 75 μ m (arriba) ó 25 μ m (abajo).

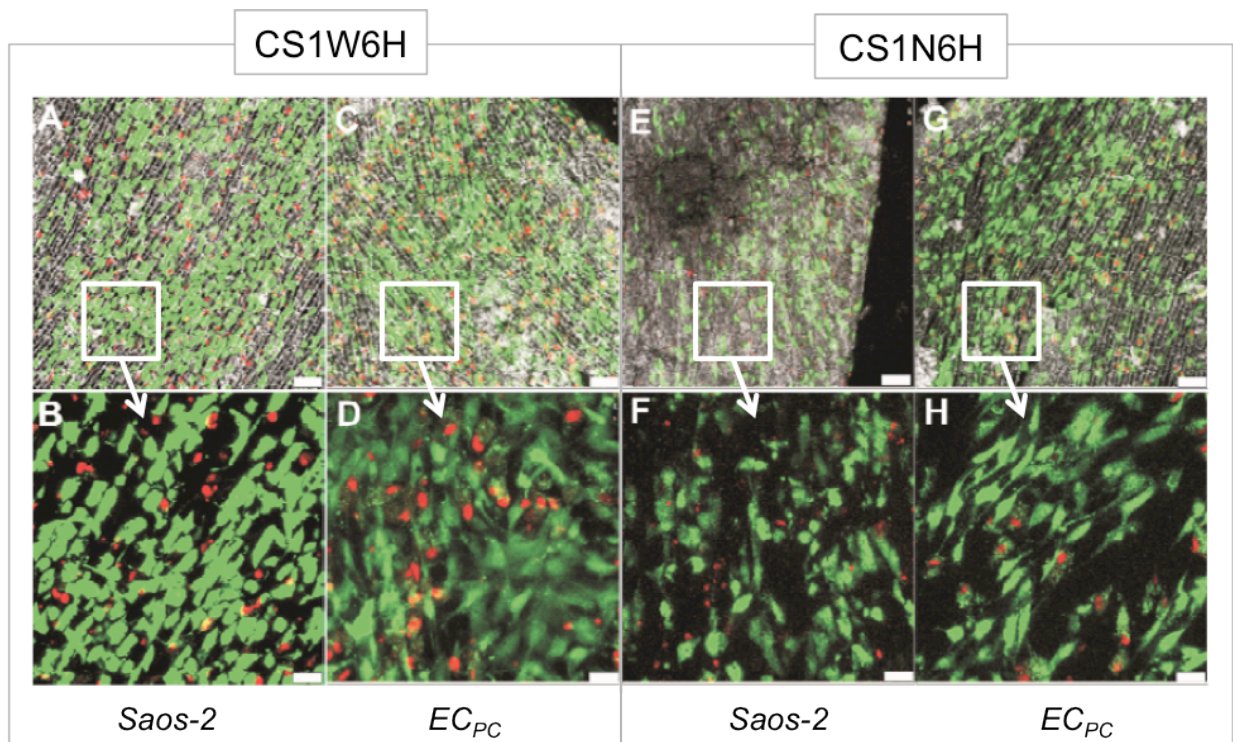


Figura 7.18. Viabilidad celular sobre *scaffolds* de sulfato de condroitina con nanotubos MWCNTs (A-D) y NHTS (E-H). Se muestran imágenes de microscopía confocal representativas de cultivos de osteoblastos Saos-2 (A-B, E-F) y de células EC_{PC} (C-D, G-H) a 48h. Las barras de escala representan 75 μ m (arriba) ó 25 μ m (abajo).

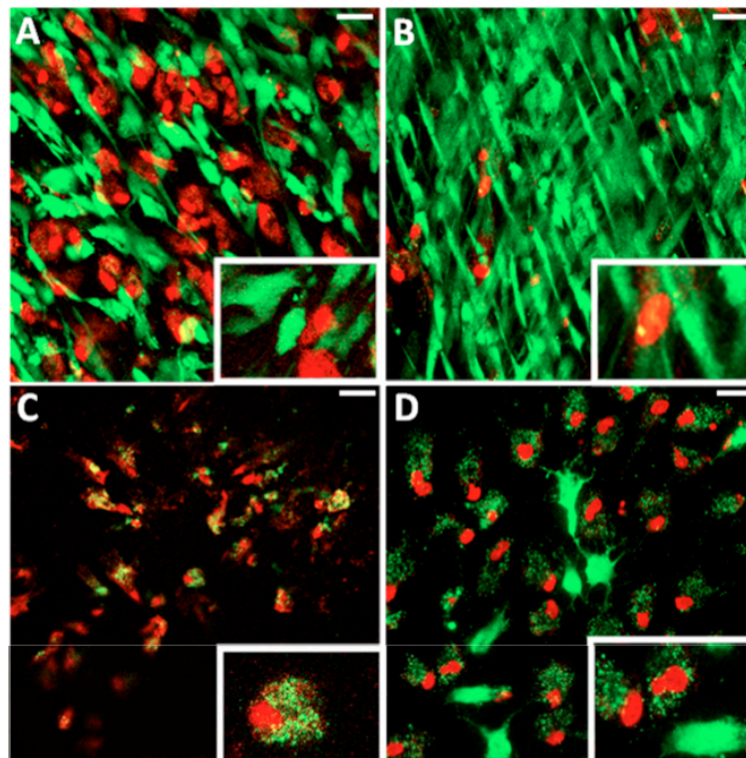


Figura 7.19. Estudios de viabilidad de células ECPC sobre *scaffolds* de sulfato de condroitina con MWCNTs (A) o NHTS (B) y *scaffolds* de gelatina con MWCNTs (C) o NHTS (D) a 48h. La viabilidad celular depende de la topografía de la superficie del *scaffolds* y de la presencia de extremos afilados de CNTs accesibles en la superficie del material. Las imágenes insertadas incluyen detalles adicionales a mayor aumento de células teñidas. Las barras de escala representan 25 μ m.

Tabla 7.5. Estudios de viabilidad celular en los *scaffolds*.

Tipos de células	<i>Scaffold</i>	Células viables (verdes) (%)	Células muertas (rojas) (%)	Células apoptóticas (verdes+rojas) (%)
L929	TCP (<i>control</i>)	99 \pm 1	1 \pm 0	0 \pm 0
	Q1W6G	88 \pm 2	10 \pm 2	2 \pm 1
	CS1W6H	96 \pm 2	4 \pm 2	0 \pm 0
	GEL1W6H	72 \pm 8	25 \pm 9	3 \pm 1
Saos-2	TCP (<i>control</i>)	99 \pm 1	1 \pm 0	0 \pm 0
	Q1W6G	76 \pm 5	19 \pm 5	5 \pm 2
	Q1N6G	76 \pm 2	23 \pm 2	1 \pm 1
	CS1W6H	82 \pm 8	14 \pm 9	4 \pm 2
	CS1N6H	83 \pm 2	15 \pm 2	2 \pm 1
	GEL1W6H	61 \pm 15	36 \pm 17	3 \pm 3
	GEL1N6H	94 \pm 1	5 \pm 2	0 \pm 0
ECPC	TCP (<i>control</i>)	98 \pm 1	2 \pm 2	0 \pm 0
	Q1W6G	50 \pm 15	11 \pm 5	39 \pm 10
	Q1N6G	58 \pm 14	14 \pm 3	28 \pm 13
	CS1W6H	73 \pm 13	4 \pm 6	23 \pm 13
	CS1N6H	90 \pm 3	5 \pm 1	5 \pm 2
	GEL1W6H	0 \pm 0	46 \pm 25	54 \pm 25
	GEL1N6H	16 \pm 7	5 \pm 5	79 \pm 8

7.3.2. ESTUDIOS DE ADHESIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR

La adhesión y la morfología de las células en cultivo sobre los *scaffolds* se evalúa mediante microscopía electrónica de barrido. En la [figura 7.20](#) se muestran cultivos de osteoblastos Saos-2 y de células EC_{PC} en los *scaffolds* de quitosano con nanotubos MWCNTs entrecruzados con glutaraldehído (Q1W6G). En ambos casos se observa que ambos tipos celulares se adhieren adecuadamente al soporte, colonizando su estructura porosa. La presencia de nanotubos no parece alterar la morfología de las células en ninguno de los casos, en coincidencia con trabajos anteriormente publicados para otros materiales con CNTs.⁷¹ El menor tamaño de los osteoblastos Saos-2 permite a estas células extenderse y penetrar ligeramente en los canales de los soportes porosos. Por el contrario, el mayor tamaño de las células EC_{PC}, y su particular patrón de adhesión, favorece una mayor extensión celular sobre la superficie del sustrato, imitando el proceso de endotelialización del tejido vascular nativo.

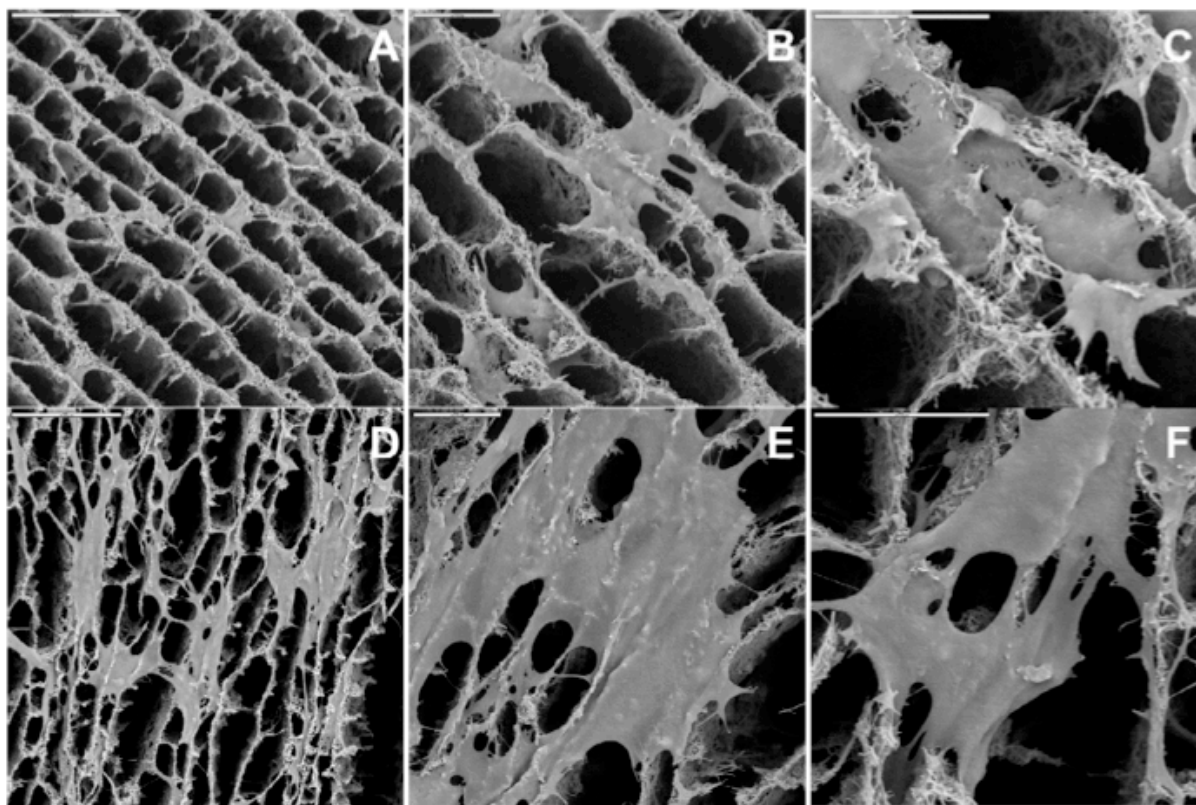


Figura 7.20. Microfotografías de SEM de cultivos celulares a 48h después de la siembra sobre *scaffolds* de quitosano y MWCNTs (Q1W6G). Las imágenes muestran la morfología de cultivos de osteoblastos humanos Saos-2 (A,B,C) y células endoteliales porcinas EC_{PC} (D,E,F). Las barras de escala representan 50 μ m (A y D) ó 20 μ m (B-C, E-F).

Con el fin de evaluar la influencia de la topografía de los *scaffolds* en la adhesión celular y la subsiguiente colonización del material, se siembran células EC_{PC} en soportes porosos de MWCNTs de diferentes polímeros (quitosano, sulfato de condroitina y gelatina) (Fig. 7.21). Como se observa en las imágenes, las células EC_{PC} son capaces de adherirse y extenderse en el *scaffold*, independientemente de su composición y estructura. Sin embargo, la distribución ordenada de canales en los *scaffolds* de sulfato de condroitina (CS1W6H) y de quitosano (Q1W6G) influye en la organización de las células sobre el soporte, dado que las células utilizan las paredes de los canales como superficie de contacto y apoyo en su proceso de adhesión. Así mismo, la falta de dicha organización en los *scaffolds* de gelatina (G1W6H) determina la formación de cultivos celulares menos orientados. En todos los casos se observa, además, que las células EC_{PC} conservan su tendencia natural a formar una monocapa sobre los sustratos, aún incluso en los de gelatina, en los que es más evidente la presencia de MWCNTs que sobresalen de las paredes de los canales formando verdaderas “espinas” para las células (Fig. 7.21-F).

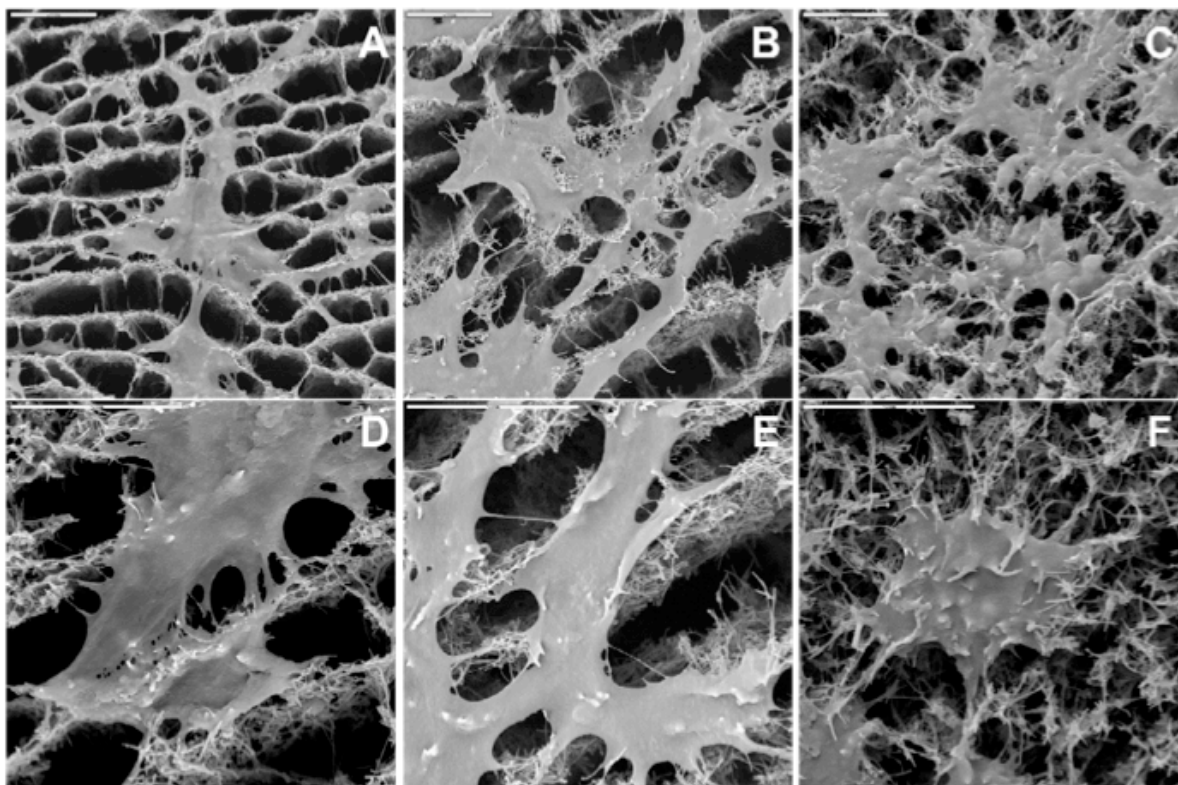


Figura 7.21. Micrografías de SEM de cultivos celulares de células EC_{PC} a 48h sobre *scaffolds* de quitosano (A,D), sulfato de condroitina (B,E) y gelatina (C,F). Las barras de escala representan 20 μm en todas las imágenes.

7.3.3. ENSAYOS DE APOPTOSIS

Diversos estudios han demostrado previamente que los CNTs pueden inducir muerte celular a través de mecanismos de apoptosis.⁷²⁻⁷³ La apoptosis, o muerte celular programada, es una forma de muerte celular controlada y orquestada genéticamente cuyo estímulo desencadenante puede proceder tanto del interior como del exterior de la célula. En los procesos de apoptosis destacan las alteraciones morfológicas del núcleo frente a las del citoplasma, al contrario de lo que ocurre en la necrosis en general. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo y accidental, que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura celular con alteración definitiva de la función normal y la inducción de un daño irreversible. En particular, la fase temprana de la apoptosis celular se caracteriza por la relocalización de la fosfatidil serina (PS) en la superficie celular externa, pudiendo ser fácilmente detectada por medio del marcaje con anexina V, una proteína con alta afinidad por la PS.⁷⁴ En base a los procesos de muerte celular detectados en los estudios de viabilidad, se procede a la realización de ensayos de apoptosis con células Saos-2 y EC_{PC} en cultivo sobre *scaffolds* de quitosano y gelatina con nanotubos MWCNTs, como ejemplo de materiales con alta y baja viabilidad celular, respectivamente. En estos estudios, la tinción simultánea con homodímero de etidio-1 (colorante nuclear) permite discriminar entre las etapas tempranas del proceso de apoptosis (fluorescencia verde), sus fases finales (verde y roja) y las células muertas (roja). En particular, aquellas células que se encuentran en los primeros estadios de apoptosis presentan una tinción verde puntiforme correspondiente a regiones de membrana en las que la fosfatidilserina se ha translocado extracelularmente. A medida que el proceso apoptótico avanza, la membrana plasmática modifica su grado de permeabilidad y permite la entrada al núcleo del homodímero de etidio-1, quedando así marcado también el ADN celular. Como se muestra en la [figura 7.22-C](#), en los cultivos de células EC_{PC} sobre *scaffolds* de quitosano se observan algunas células en las etapas apoptóticas iniciales (verde) y finales (verde y rojo), así como algunas células muertas (rojo). Sin embargo, en los *scaffolds* de gelatina, el número de células marcadas positivamente en verde (células apoptóticas) se incrementa significativamente, confirmando así que la dramática disminución en la viabilidad celular sobre estos *scaffolds* descrita anteriormente está ligada, al menos parcialmente, a la inducción de procesos de apoptosis celular ([Fig. 7.22-D](#)). Contrariamente a los resultados obtenidos con células EC_{PC}, los cultivos con osteoblastos Saos-2 sobre *scaffolds* de quitosano muestran un porcentaje de muerte celular prácticamente despreciable (tanto necrosis como

apoptosis) (Fig. 7.22-G). En el caso de los soportes de gelatina, aunque se observan algunas células muertas, la mayor parte del cultivo permanece viable (Fig. 7.22-H).

En conclusión, estos resultados confirman que en los cultivos de osteoblastos Saos-2 la presencia de nanotubos de carbono en los *scaffolds* no induce ni apoptosis ni necrosis celular de forma significativa. Por el contrario, los cultivos de células EC_{PC} experimentan un mayor porcentaje de muerte celular en los *scaffolds*, en su mayoría a través de procesos de tipo apoptótico, y con consecuencias especialmente dramáticas sobre los soportes de gelatina.

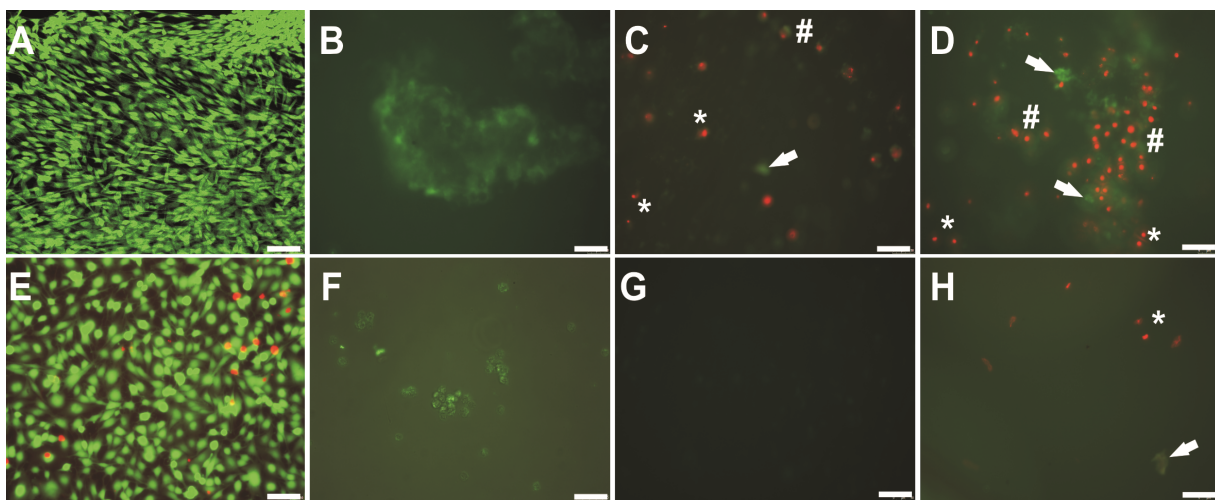


Figura 7.22. Estudios de apoptosis con células EC_{PC} (A-D) y Saos-2 (E-H) sobre *scaffolds* de quitosano (C,G) y gelatina (D,H). La viabilidad inicial de los cultivos se confirma mediante tinción con calceína y homodímero de etidio-1 (A,E). Como control positivo de apoptosis, las células se incuban con H₂O₂ durante 1 h (B,F). Las células en apoptosis temprana muestran exclusivamente marcaje verde (flechas blancas), mientras que las células muertas aparecen marcadas sólo de rojo (*). Las células con doble marcaje indican estadios de apoptosis tardía (#). Las barras de escala representan 75 μm en todas las imágenes.

7.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Mediante el uso de la metodología ISISA, una ruta biocompatible de síntesis, se han preparado varios soportes porosos tridimensionales con distintos tipos de nanotubos de carbono (MWCNTs y NHTS) y diferentes polímeros como agentes dispersantes (quitosano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, gelatina y elastina). Manteniendo constantes las concentraciones de ambos componentes (tanto de los CNTs como de polímero) se han obtenido estructuras diferentes en cuanto a morfología, propiedades mecánicas y conductividad.

Con el objetivo futuro de emplear estos materiales en Ingeniería de tejidos se ha estudiado *in vitro* la biocompatibilidad de los distintos soportes fabricados con diferentes tipos celulares (fibroblastos L929, osteoblastos Saos-2 y células endoteliales EC_{PC}).

En términos generales, se ha observado una buena adhesión de los distintos tipos celulares a los diferentes soportes, con mantenimiento de la morfología celular y la colonización de los *scaffolds* conforme a su topografía. Así mismo, la presencia de extremos afilados de CNTs en la superficie del soporte y el tipo celular parecen parámetros críticos en la viabilidad de los cultivos sobre los *scaffolds*. Los estudios de viabilidad evidencian, además, que los *scaffolds* preparados con nanotubos cortos (NHTS) muestran, en general, una mayor viabilidad celular, que se acompaña con un empeoramiento de las propiedades mecánicas y de la conductividad.

En conclusión, estos estudios han permitido evaluar a nivel celular y de forma exhaustiva la reactividad de los distintos *scaffolds* de nanotubos de carbono fabricados con sistemas biológicos diversos, poniendo en evidencia una adecuada biocompatibilidad para la mayoría de estos materiales. Estudios posteriores permitirán, partiendo de la base de estos resultados, optimizar la preparación de biomateriales basados en estos soportes tridimensionales porosos para su uso futuro en Ingeniería de tejidos.

7.5. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ E.T. Thostenson, Z. Ren, T.-W. Chou, "Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review" *Composites Science and Technology* 61 (2001) 1899-1912.
- ² H. Dai, "Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties" *Accounts of Chemical Research* 35 (2002) 1035-1044.
- ³ P.A. Tran, L. Zhang, T.J. Webster, "Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine" *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1097-1114.
- ⁴ D.Y. Lewitus, J. Landers, J.R. Branch, K.L. Smith, G. Callegari, J. Kohn, A.V. Neimark, "Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering" *Advanced Functional Materials* 21 (2011) 2424-2632.
- ⁵ B.S. Harrison, A. Atala, "Carbon nanotube applications for tissue engineering" *Biomaterials* 28 (2007) 344-353.
- ⁶ M. Yin, M. Wang, F. Miao, Y. Ji, Z. Tian, H. Shen, N. Jia, "Water-dispersible multiwalled carbon nanotube/iron oxide hybrids as contrast agents for cellular magnetic resonance imaging" *Carbon* 50 (2012) 2162-2170.
- ⁷ G. Hong, J.Z. Wu, J.T. Robinson, H. Wang, B. Zhang, H. Dai, "Three-dimensional imaging of single nanotube molecule endocytosis on plasmonic substrates" *Nature Communications* 3 (2012) 700.
- ⁸ Y. Liao, C. Zhang, Y. Zhang, V. Strong, J. Tang, X.-G. Li, K. Kalantar-zadeh, E.M.V. Hoek, K.L. Wang, R.B. Kaner, "Carbon nanotube/polyaniline composite nanofibers: facile synthesis and chemosensors" *Nano Letters* 11 (2011) 954-959.
- ⁹ C. Dhand, S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra, "Polyaniline-carbon nanotube composite film for cholesterol biosensor" *Analytical Biochemistry* 383 (2008) 194-199.
- ¹⁰ Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai, "Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment" *Cancer Research* 68 (2008) 6652-6660.
- ¹¹ G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.-P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, "Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery" *Chemical Communications* (2006) 1182-1184.
- ¹² P.R. Supronowicz, P.M. Ajayan, K.R. Ullmann, B.P. Arulanandam, D.W. Metzger, R. Bizios, "Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 59 (2002) 499-506.
- ¹³ L. Pan, X. Pei, R. He, Q. Wan, J. Wang, "Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 93 (2012) 226-234.
- ¹⁴ J.V. Veetil, K. Ye, "Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications" *Biotechnology Progress* 25 (2009) 709-721.
- ¹⁵ D.F. Williams, "The Williams Dictionary of Biomaterial" Liverpool, UK. University Press, (1999) p.40.
- ¹⁶ J.S. Kim, K.S. Song, J.H. Lee, I.J. Yu, "Evaluation of biocompatible dispersants for carbon nanotube toxicity tests" *Archives of Toxicology* 85 (2011) 1499-1508.
- ¹⁷ X. Zhao, R. Liu, "Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell and biomacromolecule levels" *Environment International* 40 (2012) 244-255.
- ¹⁸ G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, "Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube and fullerene" *Environmental Science & Technology* 39 (2005) 1378-1383.
- ¹⁹ C-W. Lam, J.T. James, R. McCluskey, R.L. Hunter, "Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation" *Toxicological Sciences* 77 (2004) 126-134.

- ²⁰ M.A. Correa-Duarte, N. Wagner, J. Rojas-Chapana, C. Morszeck, M. Thie, M. Giersig, "Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth" *Nano Letters* 4 (2004) 2233-2236.
- ²¹ H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J.-P. Briand, M. Prato, S. Muller, A. Blanco, "Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells" *Nano Letters* 6 (2006) 1522-1528.
- ²² K. Pulskamp, S. Diabaté, H.F. Krug, "Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants" *Toxicology Letters* 168 (2007) 58-74.
- ²³ S. Garibaldi, C. Brunelli, V. Bavastrello, G. Ghigliotti, C. Nicolini, "Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells" *Nanotechnology* 17 (2006) 391-397.
- ²⁴ R.A. MacDonald, B.F. Laurenzi, G. Viswanathan, P.M. Ajayan, J.P. Stegemann, "Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 74 (2005) 489-496.
- ²⁵ E. Jan, N.A. Kotov, "Successful differentiation of mouse neural stem cells on layer-by-layer assembled single-walled carbon nanotube composite" *Nano Letters* 7 (2007) 1123-1128.
- ²⁶ H. Isobe, T. Tanaka, R. maeda, E. Noiri, N. Solin, M. Yudasaka, S. Iijima, E. Nakamura, "Preparation, purification, characterization, and cytotoxicity assessment of water-soluble, transition-metal-free carbon nanotube aggregates" *Angewandte Chemie International Edition* 45 (2006) 6676-6680.
- ²⁷ J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J.-F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Lison, "Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes" *Toxicology and Applied Pharmacology* 207 (2005) 221-231.
- ²⁸ A. Patlolla, B. Patlolla, P. Tchounwou, "Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube" *Molecular and Cellular Biochemistry* 338 (2010) 225-232.
- ²⁹ M.A. Herrero, L. Lacerda, A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, "Functionalised carbon nanotubes: High biocompatibility with lack of toxicity" *International Journal of Nanotechnology* 8 (2011) 885-897.
- ³⁰ S. Weiner, H.D. Wagner, "The material bone: structure-mechanical function relations" *Annual Review of Materials Science* 28 (1998) 271-298.
- ³¹ M. Cadek, J.N. Coleman, V. Barron, K. Hedicke, W.J. Blau, "Morphological and mechanical properties of carbon nanotube reinforced semicrystalline and amorphous polymer composites" *Applied Physics Letters* 81 (2002) 5123-5125.
- ³² S. Xinfeng, L.H. Jared, P.S. Patrick, M.T. James, K. Ramanan, G.M. Antonios, "Rheological behaviour and mechanical characterization of injectable poly(propylene fumarate)/single-walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering" *Nanotechnology* (2005) S531.
- ³³ M.M.J. Treacy, T.W. Ebbesen, J.M. Gibson, "Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes" *Nature* 381 (1996) 678-680.
- ³⁴ S. Iijima, C. Brabec, A. Maiti, J. Bernholc, "Structural flexibility of carbon nanotubes" *Journal of Chemical Physics* 104 (1996) 2089-2092.
- ³⁵ R.L. Price, M.C. Waid, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, "Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers" *Biomaterials* 24 (2003) 1877-1887.
- ³⁶ K.L. Elias, R.L. Price, T.J. Webster, "Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers" *Biomaterials* 23 (2002) 3279-3287.
- ³⁷ P.A. Tran, L. Sarin, R.H. Hurt, T.J. Webster, "Opportunities for nanotechnology-enabled bioactive bone implants" *Journal of Materials Chemistry* 19 (2009) 2653-2659.

- ³⁸ N. Zhang, H. Yan, X. Wen, "Tissue-engineering approaches for axonal guidance" *Brain Research Reviews* 49 (2005) 48-64.
- ³⁹ G.R.D. Evans, "Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs" *The anatomical Record* 263 (2001) 396-404.
- ⁴⁰ H. Millesi, "In: Operative Nerve Repair and Reconstruction - Indications and techniques of nerve grafting" Ed: R.H. Gelbertman, J.B. Lippincott, Philadelphia (1991) pp.525-544.
- ⁴¹ J.K. Terzis, D.D. Sun, P.K. Thanos, "Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair" *Journal of Reconstructive Microsurgery* 13 (1997) 215-225.
- ⁴² R.B. James, "Peripheral nerve and neuromuscular allotransplantation: current status" *Microsurgery* 20 (2000) 384-388.
- ⁴³ A.A. Zalewski, A.K. Gulati, "Rejection of nerve allografts after cessation of immuno suppression with cyclosporin A" *Transplantation* 31 (1981) 88-89.
- ⁴⁴ J.N. Turner, W. Shain, D.H. Szarowski, M. Andersen, S. Martins, M. Isaacson, H. Craighead, "Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants" *Experimental Neurology* 156 (1999) 33-49.
- ⁴⁵ D.J. Edell, V. Van Toi, V.M. McNeil, L.D. Clark, "Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex" *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 39 (1992) 635-643.
- ⁴⁶ E.R. Aurand, K.J. Lampe, K.B. Bjugstad, "Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering" *Neuroscience Research* 72 (2012) 199-213
- ⁴⁷ S. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon" *Nature* 354 (1991) 56-58.
- ⁴⁸ M. Monthieux, V. L. Kuznetsov, "Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes" *Carbon* 44 (2006) 1621-1623.
- ⁴⁹ W. Wei, A. Sethuraman, C. Jin, N.A. Monteiro-Riviere, R.J. Narayan, "Biological properties of carbon nanotubes" *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7 (2007) 1284-1297.
- ⁵⁰ D.Y. Lewitus, J. Landers, J.R. Branch, K.L. Smith, G. Callegari, J. Kohn, A.V. Neimark, "Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering" *Advanced Functional Materials* 21 (2011) 2624-2632.
- ⁵¹ L. Zhang, T.J. Webster, "Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration" *Nano Today* 4 (2009) 66-80.
- ⁵² S.K. Seidlits, J.Y. Lee, C.E. Schmidt, "Nanostructured scaffolds for neural applications" *Nanomedicine* 3 (2008) 183-199.
- ⁵³ K. Hata, D.N. Futaba, K. Mizuno, T. Namai, M. Yumura, S. Iijima, "Water-assisted highly efficient synthesis of impurity-free single-walled carbon nanotubes" *Science* 306 (2004) 1362-1364.
- ⁵⁴ B.S. Harrison, A. Atala, "Carbon nanotube applications for tissue engineering" *Biomaterials* 28 (2007) 344-353.
- ⁵⁵ M. Mattson, R. Haddon, A. Rao, "Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth" *Journal of Molecular Neuroscience* 14 (2000) 175-182.
- ⁵⁶ H. Hu, Y. Ni, S.K. Mandal, V. Montana, B. Zhao, R.C. Haddon, V. Papura, "Polyethyleneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth" *The Journal of Physical Chemistry B* 109 (2005) 4285-4289.
- ⁵⁷ V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato, L. Ballerini, "Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling" *Nano Letters* 5 (2005) 1107-1110.
- ⁵⁸ E.W. Keefer, B.R. Botterman, M.I. Romero, A.F. Rossi, G.W. Gross, "Carbon nanotube coating improves neuronal recordings" *Nature Nanotechnology* 3 (2008) 434-439.

- ⁵⁹ A.A. Mamedov, N.A. Kotov, M. Prato, D.M. Guldi, J.P. Wicksted, A. Hirsch, Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites, *Nat. Mater.* 1 (2002) 190-194.
- ⁶⁰ M.K. Gheith, V.A. Sinani, J.P. Wicksted, R.L. Matts, N.A. Kotov, "Single-walled carbon nanotube polyelectrolyte multilayers and freestanding films as a biocompatible platform for neuroprosthetic implants" *Advanced Materials* 17 (2005) 2663-2670.
- ⁶¹ M.K. Gheith, T.C. Pappas, A.V. Liopo, V.A. Sinani, B.S. Shim, M. Motamedi, J.P. Wicksted, N.A. Kotov, "Stimulation of neural cells by lateral currents in conductive layer-by-layer films of single-walled carbon nanotubes" *Advanced Materials* 18 (2006) 2975-2979.
- ⁶² M.C. Gutiérrez, Z. García-Carvajal, M. Jobbagy, F. Rubio, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies for drug delivery and controlled release" *Advanced Functional Materials* 17 (2007) 3505-3513.
- ⁶³ R. Shvartzman-Cohen, E. Nativ-Roth, E. Baskaran, Y. Levi-Kalisman, I. Szleifer, R. Yerushalmi-Rozan, "Selective dispersion of single-walled carbon nanotubes in the presence of polymers: the role of molecular and colloidal length scales" *Journal of American Chemical Society* 126 (2004) 14850-14857.
- ⁶⁴ T. Inada, S.-S. Lu, "Inhibition of recrystallization of ice grains by adsorption of poly(vinyl alcohol) onto ice surfaces" *Crystal Growth and Design* 3 (2003) 747-752.
- ⁶⁵ K.P.-A. Saffar, A.R. Arshi, N. JamilPour, A.R. Najafi, G. Rouhi, L. Sudak, "A cross-linking model for estimating Young's modulus of artificial bone tissue grown on carbon nanotube scaffold" *Journal of Biomedical Materials Research A* 94 (2010) 594-602.
- ⁶⁶ B.A. Harley, J.H. Leung, E.C.C.M. Silva, L.J. Gibson, "Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds" *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 463-474.
- ⁶⁷ H. Hu, Y. Ni, V. Montana, R.C. Haddon, V. Parpura, "Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth" *Nano Letters* 4 (2004) 507-511.
- ⁶⁸ M.C. Serrano, R. Pagani, M. Vallet-Regí, J. Peña, A. Rámila, I. Izquierdo, M. T. Portolés, "In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts" *Biomaterials* 25 (2004) 5603-5611.
- ⁶⁹ L. Zhu, D. W. Chang, L. Dai, Y. Hong, "DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells" *Nano Letters* 7 (2007) 3592-3597.
- ⁷⁰ S. Mwenifumbo, M.S. Shaffer, M.M. Stevens, "Exploring cellular behaviour with multi-walled carbon nanotube constructs" *Journal of Materials Chemistry* 17 (2007) 1894-1902.
- ⁷¹ R.A. MacDonald, B.F. Laurenzi, G. Viswanathan, P.M. Ajayan, J.P. Stegemann, "Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 74 (2005) 489-496.
- ⁷² W.-W. Cheng, Z.-Q. Lin, B.-F. Wei, Q. Zeng, B. Han, C.-X. Wei, X.-J. Fan, C.L. Hu, L.H. Liu, J.H. Huang, X. Yang, Z.-G. Xi, "Single-walled carbon nanotube induction of rat aortic endothelial cell apoptosis: Reactive oxygen species are involved in the mitochondrial pathway" *The International journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (2011) 564-572.
- ⁷³ P. ravichandran, S. Baluchamy, B. Sadanandan, R. Gopikrishnan, S. Biradar, V. Ramesh, J.C. Hall, F.T. Ramesh, "Multiwalled carbon nanotubes activate NF- κ B and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells" *Apoptosis* 15 (2010) 1507-1516.
- ⁷⁴ F. Varga, E. Luegmayr, N. Fratzl-Zelman, H. Glantschnig, A. Ellinger, D. Prinz, M. Rumpler, K. Klaushofer, "Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis" *Journal of Endocrinology* 160 (1999) 57-65.

**VIII. ESTUDIOS PRELIMINARES DE COLONIZACIÓN
EN FLUJO DE *SCAFFOLDS* DE NANOTUBOS DE
CARBONO**

8.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado, una estrategia importante para favorecer el crecimiento celular de las células en tres dimensiones es la fabricación de soportes tridimensionales porosos (*scaffold*) empleando polímeros biodegradables.¹⁻² Las estructuras interconectadas porosas de los *scaffolds* están diseñadas para proporcionar un material en el que las células penetren, se adhieren y proliferen, hasta generar su propia matriz extracelular y permitir la vascularización del material antes la degradación del soporte.³ Sólo en estas condiciones el crecimiento celular puede imitar las condiciones de crecimiento *in vivo*. El atractivo de este tipo de materiales reside en su potencial mimetismo con la matriz extracelular, no sólo en términos de estructura, sino también de composición química y propiedades mecánicas. Aunque la biocompatibilidad y la adhesión celular son otros requisitos esenciales.⁴⁻⁵ El gran reto en el uso de *scaffolds* para la formación de un tejido funcional, consiste en alcanzar una colonización celular uniforme a lo largo de toda la estructura macroporosa,⁶⁻⁷ ya que la adhesión en la periferia del soporte es a menudo favorecida con respecto al crecimiento en el interior.⁸

8.1.1. LIMITACIONES EN LA COLONIZACIÓN DE SCAFFOLDS 3D

El cuerpo humano proporciona a sus propios tejidos las cantidades adecuadas de oxígeno y nutrientes necesarios a través de los vasos sanguíneos. En este sentido, cabe señalar que ninguna célula, a excepción de los condrocitos, sobreviven a una distancia mayor de 25-100 µm lejos de un suministro de sangre.⁹ La baja necesidad de oxígeno en el cartílago puede ser la razón de los exitosos cultivos de este tejido *in vitro*, utilizando técnicas convencionales de fabricación.¹⁰⁻¹¹ Sin embargo, la mayoría de los tejidos 3D requieren un alto contenido de oxígeno y un flujo continuo de nutrientes.

En este contexto, lo ideal sería fabricar *scaffolds* parecidos a los tejidos originales y que, de alguna forma, presenten un sistema vascular artificial que aumente el transporte de oxígeno y nutrientes hasta las partes más interna, y permita la eliminación de los productos de desecho. Actualmente, una de las limitaciones más importantes en el crecimiento homogéneo de las células sobre los *scaffolds* es debida a la baja difusión de los nutrientes y desechos a lo largo de todo el soporte (Fig. 8.1). En general, una vez que las células se siembran en el *scaffold*, se suministra el oxígeno y los nutrientes a partir del medio de cultivo celular (Fig. 8.1-a). Comienzan así a proliferar y a migrar por la estructura, hasta colonizar completamente los poros más cercanos a la superficie (Fig. 8.1-b/c/d). La capa de células más externa consume

más oxígeno y nutrientes, además de limitar la difusión de estos componentes a lo largo del soporte, reduciendo así la cantidad disponible para aquellas células que consiguen migrar a los puntos más profundos del soporte. Así, la migración celular se detiene por falta de oxígeno y aporte de nutrientes. La profundidad de penetración celular (D_p) es establecida por la capa de células que sobrevive en la zona de concentraciones de oxígeno y nutrientes adecuada (Fig. 8.1-e). En particular, en los soportes para tejido óseo, se ha observado que las elevadas cantidades de nutrientes y oxígeno en la superficie del soporte promueve la mineralización de la superficie del *scaffold*, limitando aún más la transferencia de masa en el interior del soporte.¹²

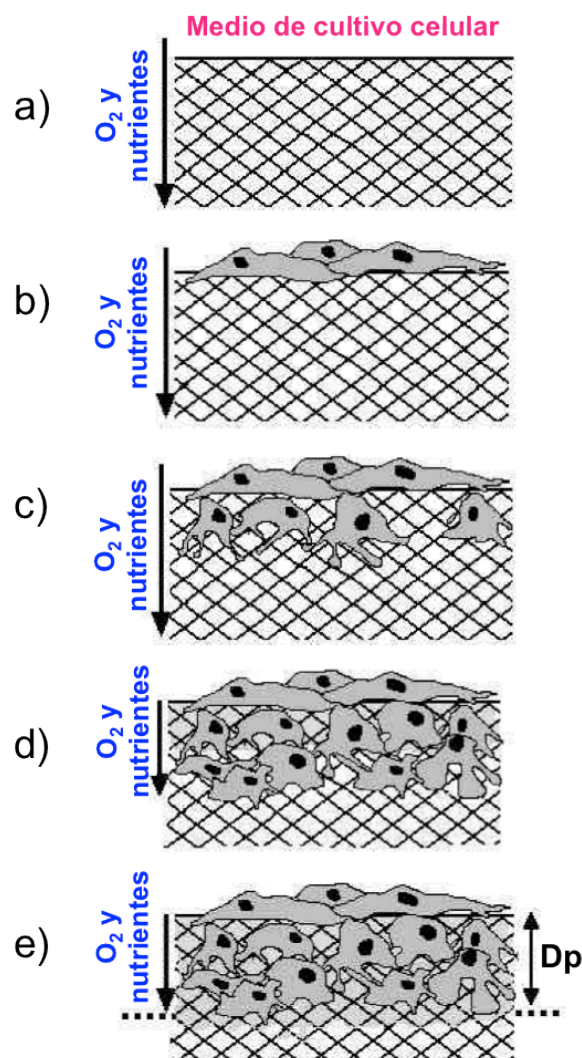


Figura 8.1. Diagrama esquemático que muestra las limitaciones de difusión de oxígeno y nutrientes en un *scaffold* para ingeniería de tejidos.⁹

En general, la imposibilidad de colonizar de modo homogéneo la mayoría de los soportes tridimensionales depende de distintos factores. De un lado, se manifiesta la falta de nutrientes y de oxígeno, y la presencia de los residuos que se producen por la actividad de la colonización por parte de las células en la periferia del soporte. Por otra parte, la adhesión de las células crea una barrera a la efectiva difusión de oxígeno y nutrientes en el interior del *scaffold*. Se necesita, por tanto, la creación de *scaffolds* con una elevada porosidad, que eviten la favorecida colonización superficial de forma completa (relleno superficial), y favorezcan el transporte de nutrientes y oxígeno a lo largo de toda la estructura porosa.

8.1.2. IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DE POROS EN LOS SCAFFOLDS

La porosidad se define como el porcentaje de espacio vacío en un sólido,¹³ y es una característica morfológica independiente del tipo de material. Como se ha mencionado, los poros de un biomaterial son considerados necesarios para la formación del tejido debido a que permiten la migración y proliferación de las células, así como la vascularización.¹⁴⁻¹⁵ Aun así, hay una cierta controversia en establecer el tamaño ideal de los poros, y estudios realizados para la formación del tejido óseo, apuntan a ~100 μm como el tamaño de poro mínimo requerido para generar hueso mineralizado. En particular, estos trabajos demuestran que los poros grandes (>100 μm) presentan un importante crecimiento del hueso, mientras que los poros intermedios de 75-100 μm sólo favorecen el crecimiento de tejido interno no mineralizado. En este caso, los poros más pequeños (10-75 μm) sólo pueden ser penetrados por la formación de tejido fibroso.¹⁶ Sin embargo, otros estudios donde se prueban implantes con distinta porosidad (50, 75, 100 y 125 μm) en defectos femorales de conejo sin cargas, demuestran que el crecimiento interno del hueso es similar en todos los tamaños de poro, sugiriendo que 100 μm no puede ser considerado el tamaño crítico de los poros, por lo menos de forma generalizada o en condiciones sin carga.¹⁷

Independientemente de las controversias sobre el tamaño ideal de los poros, que varía según la especie, o el tipo de tejido que se desea remplazar, se ha demostrado sobradamente la necesidad de fabricar biomateriales porosos.¹⁸ En particular, en la regeneración de tejido óseo, la necesidad de tener un material altamente poroso, se ha demostrado en implantes de partículas de hidroxiapatita, densas o porosas, para la liberación de la proteína BMP-2. En estos experimentos no se manifiesta la formación de hueso nuevo sobre las partículas sólidas, mientras se observa osteogénesis directa sobre las partículas porosas.¹⁹ Otra prueba de la

importancia de la porosidad en este tipo de aplicaciones, se ha obtenido con las mejoras encontradas en implantes recubiertos con material poroso, en comparación con los implantes no recubiertos.²⁰⁻²¹ Aunque se ha demostrado que la macroporosidad (tamaño de poro > 50 μm) tiene un fuerte impacto en los resultados osteogénicos, la microporosidad (tamaño de poro <10 μm) y la rugosidad de la pared del poro, también desempeñan un papel fundamental en el éxito del biomaterial. Por ejemplo, los materiales cerámicos de hidroxiapatita, con un tamaño medio de poro de 200 μm y paredes lisas, no inducen la formación de hueso ectópico en perros, en contraste con soportes hechos del mismo material, con un tamaño de poro medio de 400 μm y con paredes porosas.²² En general, mientras la microporosidad contribuye a una mayor adsorción de proteínas,²³ así como a un intercambio de iones más fácil,²⁴⁻²⁵ la rugosidad superficial, aumenta la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células. Otro factor a tener en cuenta es la interconectividad de los poros, que influye positivamente en la velocidad de deposición ósea, y en la profundidad de la infiltración *in vitro* e *in vivo*.²⁶ También, se ha demostrado que una regular distribución de los poros interconectados es capaz de guiar el crecimiento celular, favorecer la vascularización del tejido y permitir una fácil eliminación de los productos de desecho.²⁷⁻²⁸ Además, se ha podido observar como el crecimiento óseo sigue la arquitectura de los *scaffolds*.²⁹

8.1.3. SOPORTES 3D DE CNTs MEDIANTE METODOLOGÍA ISISA

En general, se ha mencionado que para conseguir una regeneración tisular exitosa es indispensable proveer a las células de un ambiente similar al de la matriz extracelular y que esto implica la necesidad de diseñar soportes que faciliten la distribución celular y guíen la regeneración tisular en tres dimensiones. Los objetivos de este capítulo son la fabricación de *scaffolds* con un tamaño de poro suficientemente grande para favorecer una colonización celular a lo largo de todo el soporte, y la realización del suministro de las propias células y de los nutrientes a estos soportes mediante experimentos en flujo a través de la porosidad del *scaffold*. Sobre la base de los conocimientos adquiridos en los capítulos precedentes, se aplica la metodología ISISA para construir *scaffolds* 3D de CNTs con un mayor tamaño de poro.³⁰ Dado que el tamaño del cristal de hielo formado durante el proceso de congelado determina la estructura macroporosa de los *scaffolds* resultantes tras el proceso de liofilización,³¹⁻³² los estudios de este apartado están centrados en controlar y promover un aumento del tamaño de los cristales durante la aplicación del proceso criogénico variando la temperatura de congelado. Esta variable que afecta a la metodología ISISA se considera la más adecuada para conseguir el

incremento de tamaño de poro, ya que, ni la disminución de la masa total de la suspensión inicial, o de la velocidad de congelado, podrían lograr el efecto deseado.

8.2. ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE CONTROL EN ISISA

Con el fin de dispersar homogéneamente los nanotubos de carbono se utilizan disoluciones acuosas diluídas de sulfato de condroitina y quitosano. Las mezclas permanecen en agitación durante 24 horas, y la dispersión final de los nanotubos de carbono en el disolvente se lleva a cabo aplicando ondas de ultrasonido (5 minutos). Estas suspensiones se recogen en jeringuillas de insulina y se congelan por inmersión a velocidad constante en un baño a temperatura controlada ([ver apartado 3.2.2.3](#)). Del liofilizado de estas muestras se obtienen monolitos constituidos en su mayor parte por CNTs. La morfología de los monolitos 3D se estudia mediante microscopía SEM. Con respecto a los resultados mostrados en los capítulos precedentes, este estudio en el control de la temperatura de congelado. A partir de los resultados obtenidos, se controlan también las otras variables que afectan la metodología ISISA, como la velocidad de congelado y la concentración de solutos.

8.2.1. LA TEMPERATURA DE CONGELADO

En la preparación de los *scaffolds* obtenidos en los capítulos precedentes se usaba un baño de nitrógeno líquido a -196 °C ([ver apartado 3.2.2.3.2](#)). Para modificar la temperatura de congelado, hay que modificar el sistema de enfriamiento. Se hacen estudios empleando un baño de etanol con dos distintos sistemas de enfriamiento, mediante nieve carbónica (~80 °C) y un criostato. La ventaja de usar el criostato reside en la posibilidad de elegir y controlar la temperatura de enfriamiento con el mismo equipo. Para elegir el mejor sistema de congelado y averiguar si efectivamente se puede mantener una temperatura constante a lo largo de todo el experimento (como con el nitrógeno líquido) se hacen estudios preliminares con los dos sistemas de enfriamiento manteniendo, en ambos casos, la temperatura a -80 °C.

Los *scaffolds* obtenidos presentan un patrón regular de poros reconocible a lo largo de toda su estructura interna ([Fig. 8.2](#)). En todos los casos, los monolitos muestran una estructura macroporosa de nanotubos interconectados, donde se puede observar claramente una variación importante del tamaño de poro con respecto a los resultados obtenidos en los capítulos anteriores. En particular, se observa que, tanto en los *scaffolds* de quitosano como en los de sulfato de condroitina, los poros aparecen de forma alargada con unas dimensiones que llegan

fácilmente a los 400 μm de largo y los 30-40 μm de ancho. Estos resultados muestran claramente cómo el aumento de la temperatura de congelado determina un notable aumento del tamaño de los cristales de hielo que se forman en la disolución acuosa, con un correspondiente aumento del tamaño de poros y una mayor acumulación de materia entre los canales.³³⁻³⁴ También se puede apreciar, que el uso de dos polímeros dispersantes distintos determina la anchura de los poros, que resultan más ancho para los *scaffolds* de quitosano que para los de sulfato de condroitina. La distinta naturaleza química de las disoluciones hace que las interacciones del soluto (polímero/nanotubos) con los cristales de hielo sea diferente. En el caso de la disolución de quitosano con nanotubos, el equilibrio de los procesos de adsorción/desorción está más desplazado hacia a la desorción.³¹

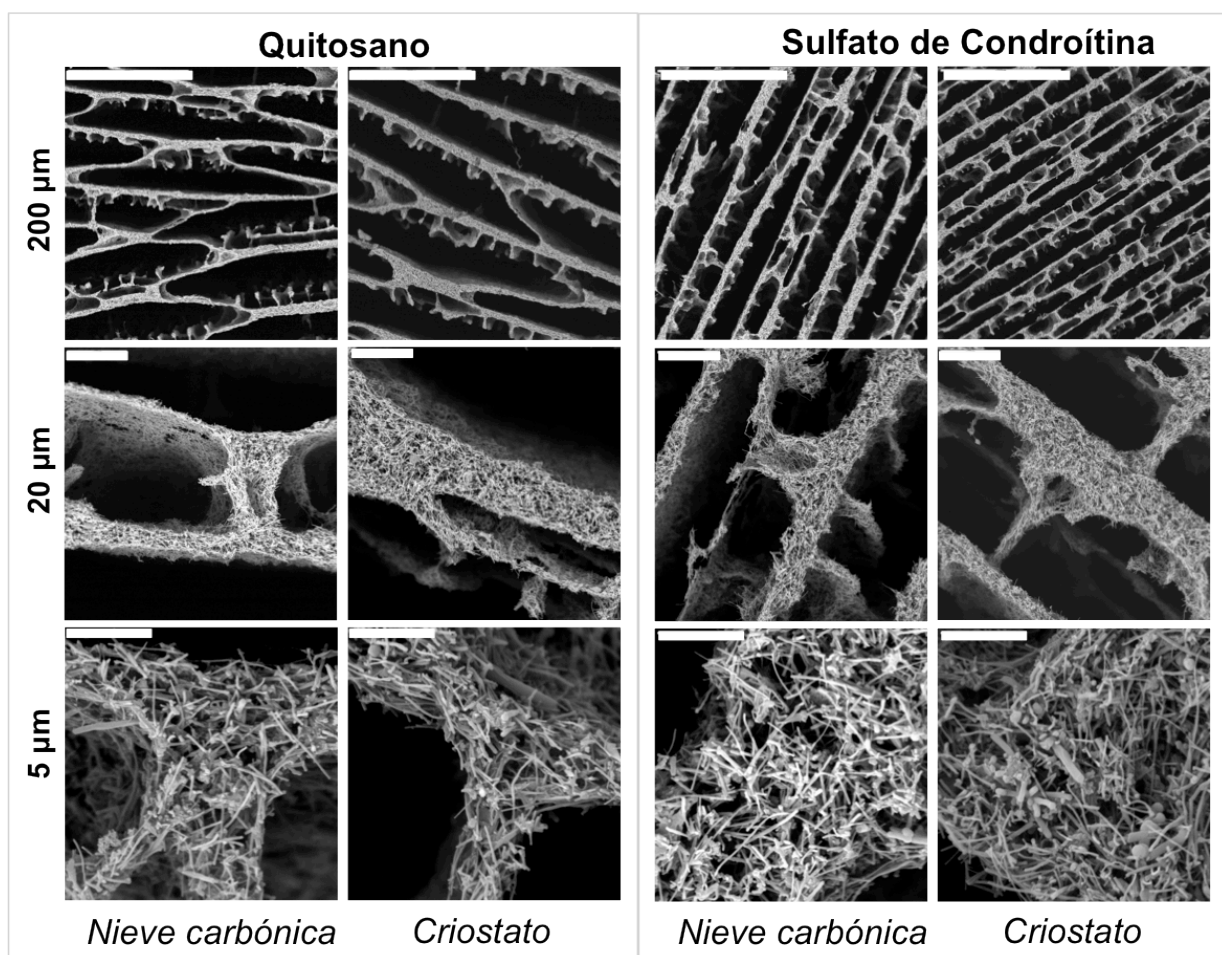


Figura 8.2. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones de MWCNTs en quitosano (Q1W6) y sulfato de condroitina (CS1W6) con métodos de enfriamiento (nieve carbónica y criostato) a la misma temperatura de congelado (- 80 °C) y a la misma velocidad de inmersión (0.7 mm/min).

No se observan variaciones importantes de la morfología de los *scaffolds* variando el método de enfriamiento. Sobre la base de este estudio preliminar, todos los soportes siguientes se preparan empleando el sistema de enfriamiento con criostato, por su facilidad de controlar y variar la temperatura de congelado.

8.2.2. LA VELOCIDAD DE CONGELADO

Como se menciona en capítulos anteriores ([ver apartado...](#)) el tamaño de los cristales de hielo formado durante el proceso de congelado también varía con la velocidad de congelado de la disolución acuosa. En este apartado, se analiza la morfología de los soportes obtenidos a partir de disoluciones acuosas con igual contenido de polímero y nanotubos de carbono (Q1W6) congeladas empleando diferentes velocidades de inmersión, esta vez en baño de etanol, a temperatura de -80 °C ([Fig. 8.3](#)).

En estas micrografías se puede apreciar cómo al ir aumentando la velocidad de inmersión, y con ello la velocidad de congelado (de 0.7 mm/min a 2.7 mm/min), va disminuyendo progresivamente el grosor de las paredes que sostienen la estructura 3D, a la par que el tamaño de los microcanales. De acuerdo con los resultados descritos en literatura, las velocidades de congelado lentas permiten la formación de cristales de hielo más grandes, que sirven como molde para obtener una estructura de canales grandes. Por otro lado, velocidades de procesamiento rápidas favorecen el subenfriamiento de la muestra impidiendo la formación de cristales de hielo grandes que da origen a la formación de una estructura de microcanales más pequeños con las paredes más finas.³⁵⁻³²

Como se esperaba, la eliminación de toda velocidad en el proceso de congelado no permite agrandar el tamaño de poro. Así en el experimento realizado a velocidad de inmersión nula (0 mm/min) no se observa una tan homogénea de los cristales de hielo, y presenta un gradiente en la dirección paralela al eje de congelación. Además no favorece la formación de poros grandes en la estructura.

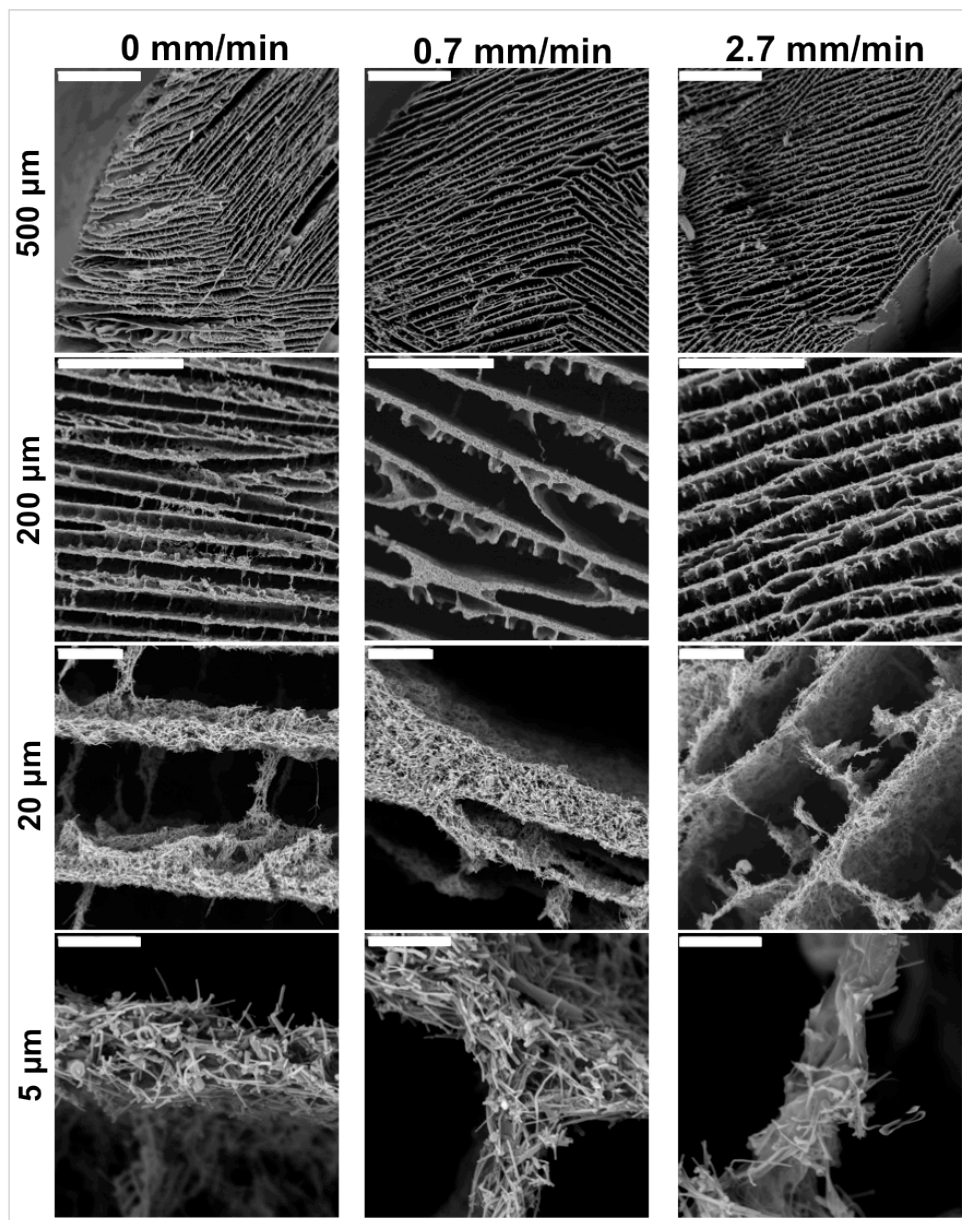


Figura 8.3. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones de quitosano al 1% p/p y nanotubos de carbono al 6% p/p congeladas a distintas velocidades de inmersión (0, 0.7 y 2.7 mm/min) en un baño de etanol a -80 °C termostático mediante criostato.

También se muestra como a una velocidad de congelado más rápida (5.9 mm/min), la variación de la temperatura de congelado (de -197 °C a -50 °C) no se provocan variaciones importantes del tamaño de los poros (Fig. 8.4). La mayor velocidad de inmersión, y por tanto de avance del frente de congelación, proporciona menos tiempo para el ordenamiento cristalino y tiende a minimizar el efecto del aumento de temperatura.

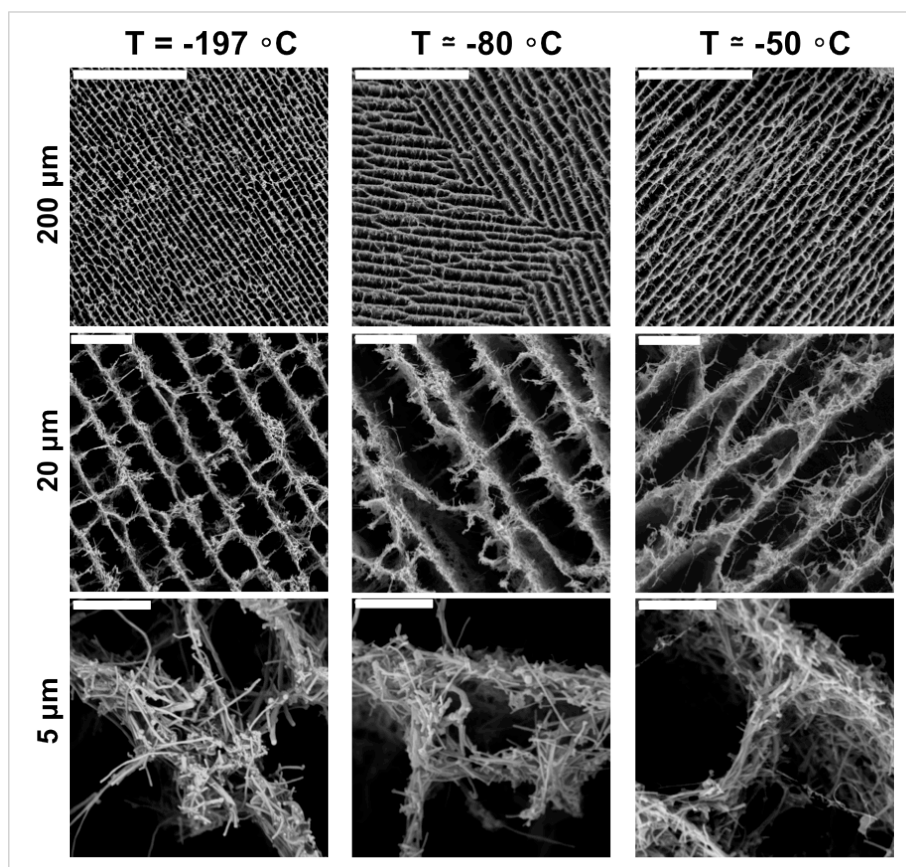


Figura 8.4. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de algunos *scaffolds* preparados a partir de suspensiones de quitosano al 1% y nanotubos de carbono MWCNTs al 6% p/p (Q1W6) a distintas temperaturas de congelado (-197 °C, -80 °C, -50 °C) y a la misma velocidad de congelado (5.9 mm/min).

8.2.3. LA CONCENTRACIÓN DEL DISPERSANTE Y EL TIPO DE CNTs

Considerando que la porosidad final de un criogel está directamente relacionada con el volumen de agua presente en la mezcla original, también se preparan muestras con distintas cantidad de agente dispersante y de nanotubos de carbono (Fig. 8.5). Comparando las micrografías de SEM, se detecta que el aumento del porcentaje de CNTs y de polímero (el quitosano) determina un aumento de las interconexiones entre las paredes y una disminución del tamaño de los poros, como es de esperar con un aumento de la densidad del soporte.

Dependiendo de las concentraciones empleadas, la presencia de los nanotubos aumenta considerablemente la viscosidad de la dispersión, debido a un incremento en la interacción superficial entre los nanotubos y el medio. Este fenómeno no permite aumentar indefinidamente el porcentaje de CNTs en la disolución inicial. En particular, en este caso, que no es posible preparar dispersiones de MWCNTs mayores al 8% (p/p) en disoluciones de quitosano muy viscosas (como la al 2.5% p/p).

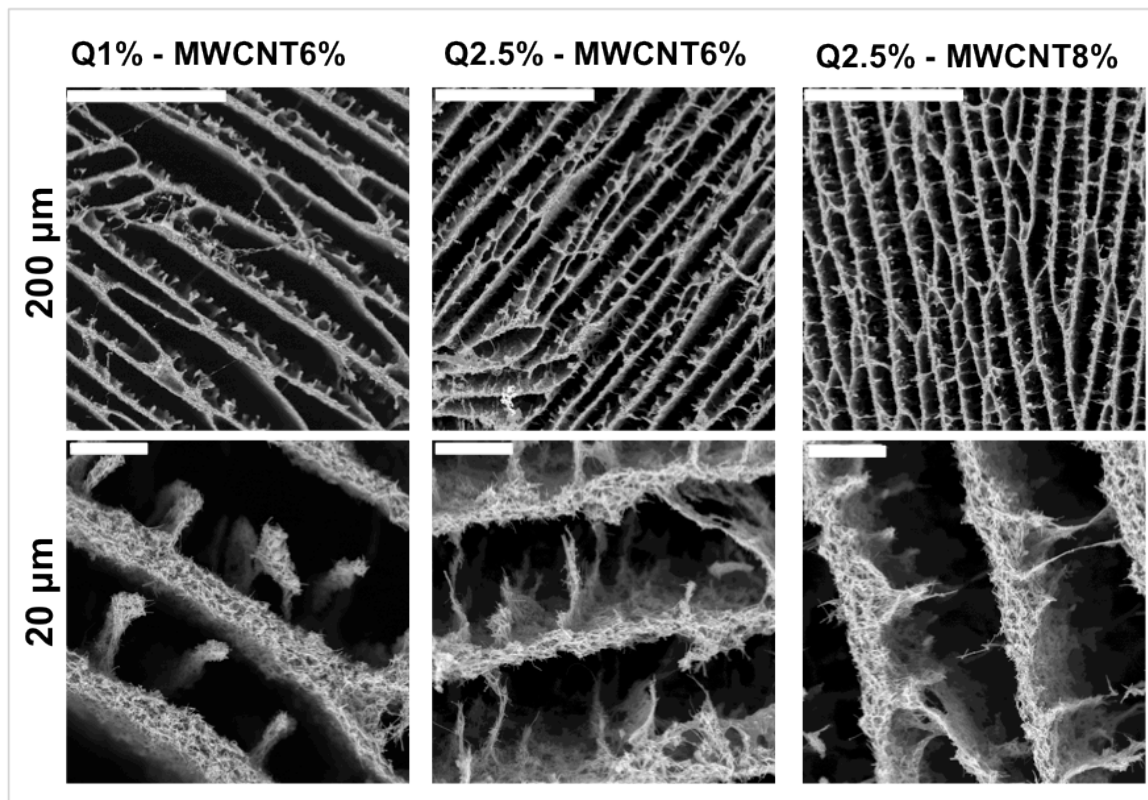


Figura 8.5. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de algunos *scaffolds* preparados a partir de suspensiones de quitosano a distintas concentraciones (1% y 2.5% p/p) y con diferentes cantidades de MWCNTs (6% y 8% p/p) congeladas a -80 °C y 0.7 mm/min.

De modo análogo se preparan *scaffolds* con nanotubos del tipo NHTS ([ver apartado 3.2.2.1.2](#)) a una temperatura de congelado de -80 °C ([Fig. 8.6](#)). Como para los soportes preparados con MWCNTs, se observa que el incremento de la temperatura del baño criogénico, aumenta el tamaño de los poros, sobre todo en los *scaffolds* de quitosano, que presentan poros con anchura de 30-40 μm. Además la presencia de NHTS, más cortos, favorece la formación de canales con paredes muy compactas donde los nanotubos no sobresalen. Como se ha mostrado en el capítulo anterior, esta característica favorece experimentos de viabilidad celular ya que evita los eventuales daños de las membranas celulares a su paso entre los canales (por el contacto con los extremos de los CNTs que sobresalen de las paredes).

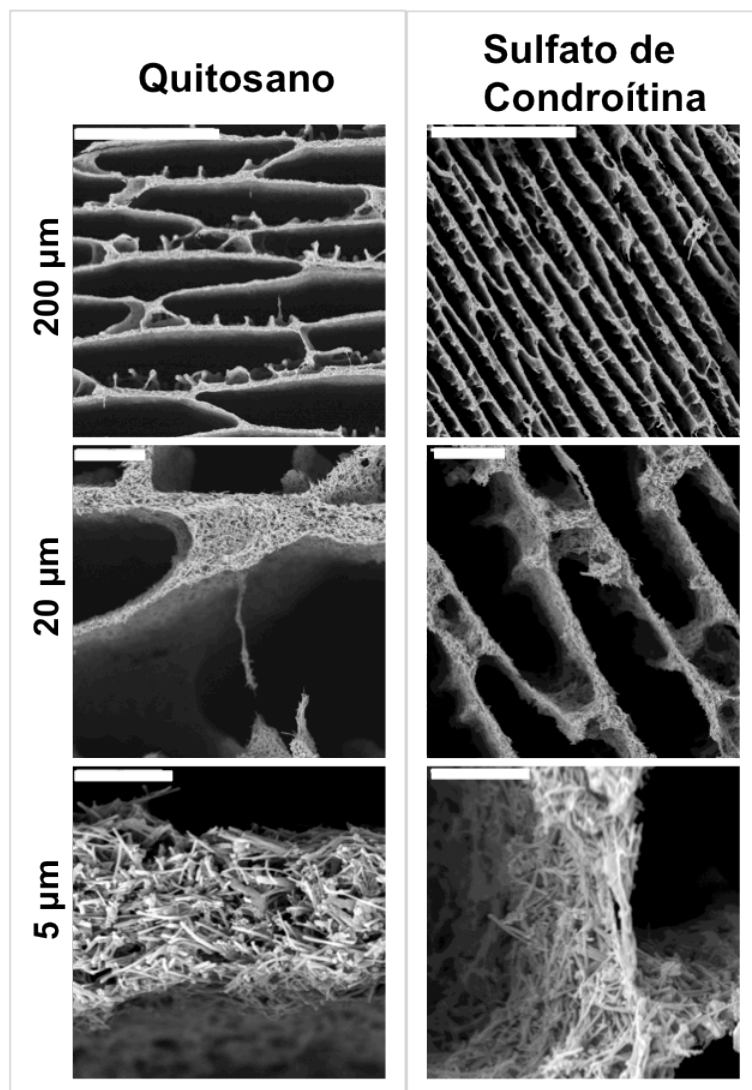


Figura 8.6. Micrografías SEM de secciones transversales (perpendicular a la dirección de congelado) de *scaffolds* preparados a partir de suspensiones de quitosano o sulfato de condroitina (1% p/p) con nanotubos NHTS (6% p/p) congeladas a -80°C y 0.7 mm/min.

8.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS *SCAFFOLDS* DE CNTs

Como se ha mostrado anteriormente, las propiedades de estos materiales (propiedades mecánicas, conductividad, etc.) varían de acuerdo con su morfología. En este apartado se muestran los resultados de la caracterización preliminar de los *scaffolds* de quitosano con los dos tipos de nanotubos utilizados (MWCNTs y NHTS).

Como se realiza en capítulos anteriores, mediante ensayos de flexión a tres puntos, se evalúa el comportamiento esfuerzo-deformación de los materiales. Por otro lado, se mide la conductividad a través de distintos *scaffolds* mediante el método de cuatro puntas ([ver apartados 3.2.2.5.2](#)). En la [tabla 8.1](#) se observan los valores de la conductividad para los

soportes con diferente tipo de CNTs. Dichos valores resultan modestos, siendo además prácticamente idénticos. Este hecho, contrasta con los valores obtenidos para *scaffolds* con composiciones análogas congelados a -197°C (1.7 S/cm para *scaffolds* con MWCNTs y <0.2 para *scaffolds* con NHTS). Como se ha mostrado en las imágenes de SEM, la morfología de los *scaffolds* preparados a -80°C resulta parecida, y la presencia de poros de gran tamaño lleva a acumular gran cantidad de material en las paredes de los canales. Esto facilita la mejora del contacto en los soportes con nanotubos cortos (NHTS) y evita una caída de la conductividad como la que se había observado para soportes con este tipo de nanotubos ([ver apartado 6.4.4](#)). En cualquier caso, el menor valor absoluto obtenido en los soportes con MWCNTs ha de estar relacionado con la mayor macroporosidad de los mismos. De igual forma, el incremento del módulo de Young obtenido para los soportes de nanotubos cortos (NHTS) respecto a los MWCNTs se puede justificar por el engrosamiento de las paredes de los canales obtenidos y la disminución en términos absolutos de esta propiedad, respecto a los valores obtenidos mediante congelado en nitrógeno líquido (5.2 y 4.0 para MWCNTs y NHTS, respectivamente) por el aumento de la macroporosidad.

Tabla 8.1. Valores de conductividad y del módulo de Young por los *scaffolds* de quitosano con NHTS o MWCNTs preparados congelando a la temperatura de -80°C y a una velocidad de congelado de 0.7 mm/min .

<i>Scaffold</i>	Conductividad ($\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Módulo de Young (MPa)
Q1W6	0.7	1.2
Q1N6	0.6	1.9

8.4. ESTUDIOS *IN VITRO* DE COLONIZACIÓN DE LOS *SCAFFOLDS*

Cuando se estudia la colonización en flujo, el tamaño celular es un parámetro crítico que hay que tener en cuenta. Las células en suspensión después el tratamiento con tripsina, en el momento de la siembra, presentan una forma esférica y un tamaño lo suficientemente pequeño (alrededor de $5\text{ }\mu\text{m}$) como para permitir la penetración celular a través de los canales de los *scaffolds* de quitosano. Sin embargo, una vez que las células comienzan a fijarse y difundir, el tipo celular influye significativamente en la distribución de las células sobre el soporte poroso. En particular, los fibroblastos L929 son células de pequeño tamaño. La elección de los

fibroblastos L929 para los experimentos mostrados a continuación, está basada en su pequeño tamaño, comparado con las otras líneas celulares, y en el hecho de que, cuando se adhieren, además de penetrar en los canales de la estructura del *scaffold*, son capaces de cubrir las paredes de los canales hasta donde alcanza el suministro de nutrientes.

Sobre la base de los estudios de biocompatibilidad de los *scaffolds* basados en MWCNTs y quitosano mostrados en el capítulo precedente, se realizaron en este apartado pruebas en flujo con fibroblastos L929 con el propósito de llegar a una colonización homogénea de todo el soporte poroso.

8.4.1. ESTUDIOS ESTÁTICOS: MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD

En primer lugar, se efectúa un estudio para comprobar la viabilidad celular. Como se comprobó con anterioridad ([ver apartado 7.3.1](#)), en los *scaffolds* de quitosano las células se orientan en la superficie de acuerdo a la distribución de los canales. Esta organización impulsada por la arquitectura del *scaffold*, se corrobora cuando se hacen experimentos con los soportes de quitosano con poros más grandes ([Fig. 8.7 y Fig. 8.8](#)). Como se observa, las células tienden a colonizar la superficie del *scaffold* de acuerdo con su topografía.

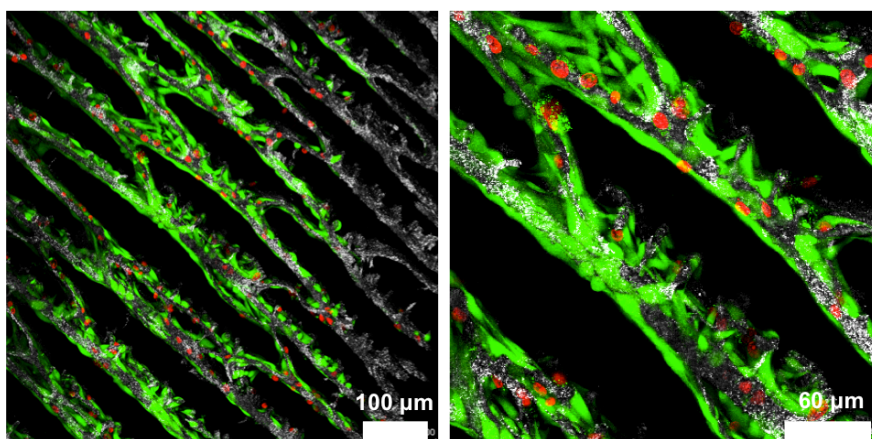


Figura 8.7. Micrografía de fluorescencia confocal en la que se muestra la influencia de las dimensiones de los canales en la colonización de los *scaffold* con fibroblastos L929 (cultivos a las 48 horas). Estudios de viabilidad celular realizados sobre *scaffolds* Q1W6 preparados congelando a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.9 mm/min).

En el caso de *scaffolds* preparados con nanotubos NHTS, que permiten la formación de paredes más gruesas y con menor número de extremos afilados de nanotubos que sobresalen, la colonización de la matriz resulta todavía más favorecida presentando mayor viabilidad ([Fig. 8.8](#)).

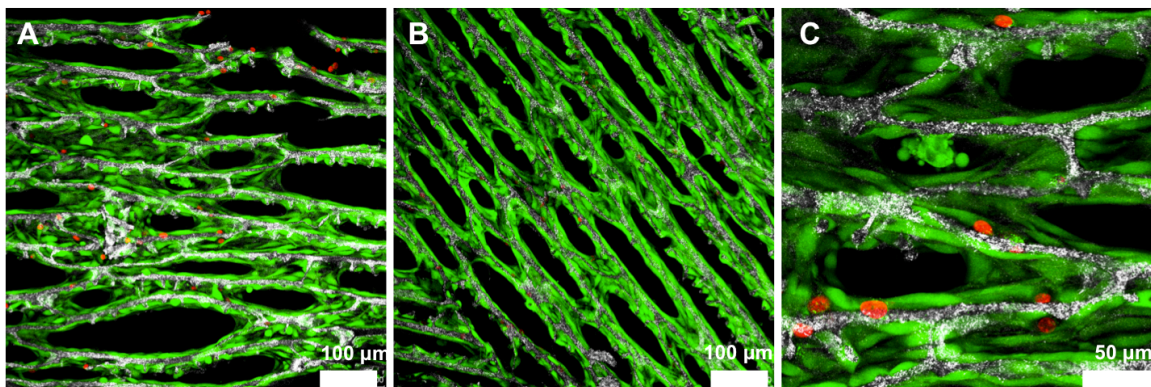


Figura 8.8. Micrografía de fluorescencia confocal en la que se muestra la influencia de las dimensiones de los canales en la colonización de los *scaffold* con fibroblastos L929 (cultivos a las 48 horas). Estudios de viabilidad celular realizados sobre *scaffolds* Q1N6 preparados congelando a -80°C (0.9 mm/min).

Hay que tener en cuenta que en ambos casos (con *scaffolds* de MWCNT y NHTS) la colonización celular resulta ser sólo superficial. Las imágenes muestran que los fibroblastos L929 se extienden y tapizan la superficie del soporte sólo por pocas micras por debajo de la superficie por las limitaciones de difusión de oxígeno y nutrientes comentadas al principio de este capítulo.

8.4.2. ESTUDIOS PRELIMINARES EN FLUJO: MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD

Un vez demostrada la viabilidad de los *scaffolds* de MWCNTs y quitosano con una configuración de canales de gran tamaño, el siguiente objetivo es la preparación de un sistema que permita la colonización en flujo. En la [figura 8.9](#) se representa esquemáticamente el montaje experimental de trabajo, donde una bomba peristáltica conduce el medio de cultivo (y los fibroblastos L929), a través de los canales del *scaffold* por toda la pieza monolítica.

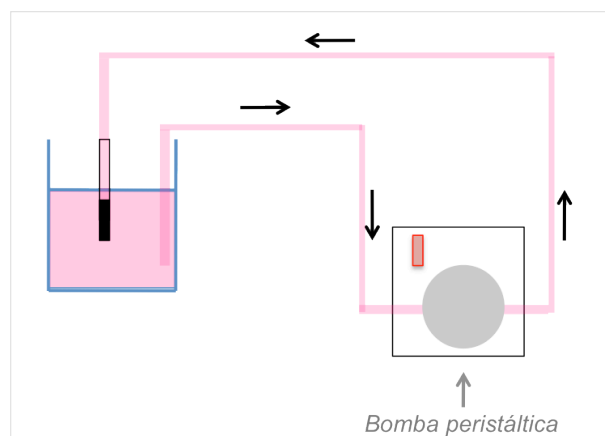


Figura 8.9. Montaje experimental de un sistema de colonización en flujo empleando una bomba peristáltica.

Para llevar a cabo la colonización en flujo de los *scaffolds* de quitosano (Q1W6), éstos se conectan a un tubo de vidrio mediante un tubo termoplástico (Fig. 8.10-arriba), y se hace pasar medio de cultivo mediante el sistema de bombeo, para rehidratar las matrices. A continuación se hacen pasar las células por el interior del *scaffold* y el soporte se deja incubar durante 24h a 37°C. Mediante imágenes de micrografía de luz dispersa se puede apreciar la estructura de láminas paralelas del *scaffold*, señal de que la estructura interna se ha mantenido tras el periodo de recirculación del cultivo. Al igual que en los experimentos de viabilidad, la colonización de los soportes se estudia mediante microscopía de fluorescencia confocal (Fig. 8.10).

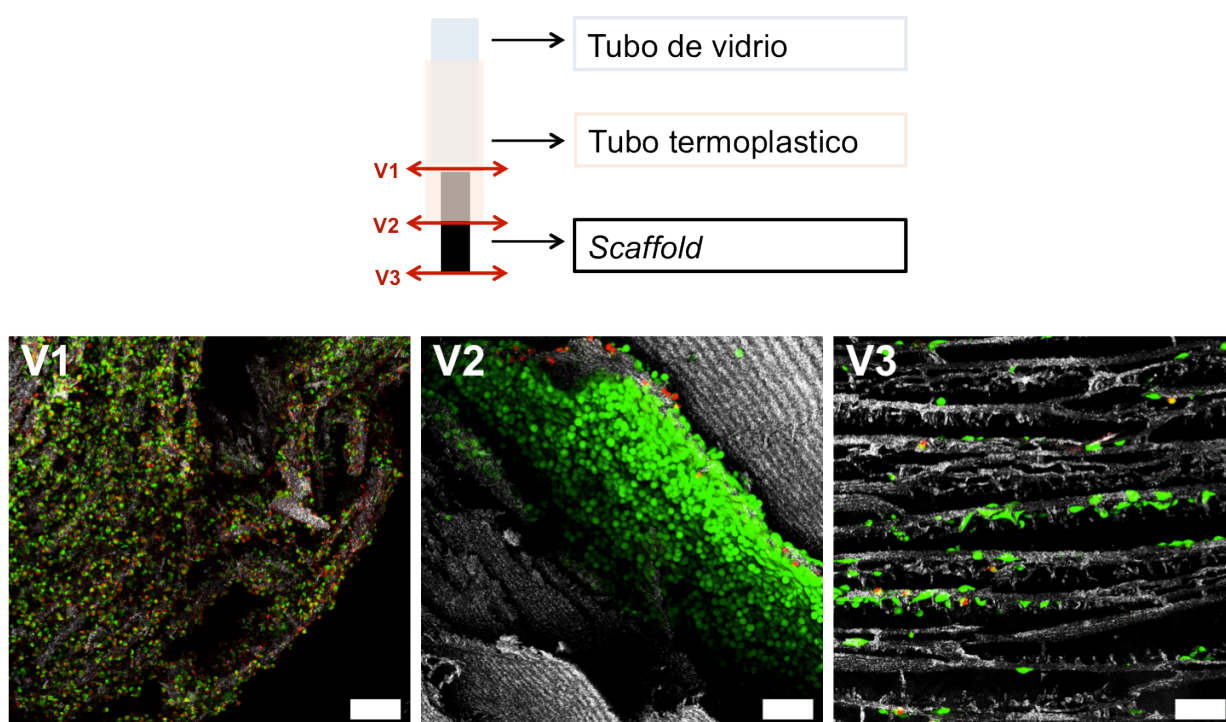


Figura 8.10. Arriba: esquema de montaje del *scaffold* para experimentos de colonización en flujo. Abajo: imágenes de microscopía confocal tomadas de cortes transversales a distintas distancias en la dirección a través de la cual fluye la suspensión de células (30 min a 0.725 mL/min) y tras haber sido incubada 24h a 37 °C. Las barras de cada imagen son de 75 μ m.

Las imágenes muestran la presencia de células en la estructura interna del monolito. En la figura 8.10-V2 se aprecia la colonización a lo largo del monolito en una dirección preferente (sobre una grieta), quizás debida a unos defectos del soporte creado durante el proceso de montaje del sistema. También se observa (Fig. 8.10-V3) que mediante el sistema de bombeo en flujo es posible obtener el paso de las células hasta la parte más interna y final del monolito. Es importante tener en cuenta que las células se encuentran acumuladas en el lado de la entrada

del flujo, justo en el punto de contacto con el *scaffold* (Fig. 8.10-V1). El elevado grado de muerte celular que se observa en esta sección inicial (V1) puede ser consecuencia de la elevada densidad celular así como el efecto de la velocidad de flujo debida al bombeo (0.750 mm/min).

Estos estudios preliminares demuestran cómo es posible una colonización en flujo de éstos tipo de soportes porosos. Como se ha comentado anteriormente, sólo se trata de resultados preliminares por lo que en la actualidad se están realizando nuevos experimentos para confirmar estos datos e introducir modificaciones que permitan mejorarlos.

8.5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este capítulo se demuestra la utilidad del proceso criogénico ISISA para construir estructuras tridimensionales de nanotubos de carbono dispersados en quitosano o sulfato de condroitina con macrocanales de gran tamaño. Variando la temperatura de congelado (-80 °C) se obtienen *scaffolds* con poros de forma alargada de hasta 400 µm de largo y 50 µm de anchura. Se logra así el objetivo de conseguir *scaffolds* con un tamaño de poro lo bastante grande como para permitir una colonización celular homogénea. En general, se observa que la homogeneidad y el grado de ordenamiento de estas estructuras varía según las variables que afectan a la metodología ISISA: temperatura, velocidad de congelado, concentración de polímero dispersante y nanotubos de carbono.

También se ha demostrado la óptima viabilidad de estos soportes en presencia de fibroblastos L929. Los experimentos preliminares en flujo muestran que los soportes preparados pueden ser considerados candidatos ideales para una colonización completa a lo largo de todo el material. Los resultados obtenidos son esperanzadores, dado que, por un lado se ha conseguido aumentar el tamaño de los poros para una colonización en flujo, y, por otro, se ha confirmado que es posible efectuar experimentos en flujo con este tipo de soportes.

8.5. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ G. Khang, M.S. Kim, H.B. Lee, "Introduction. Manuals in biomedical research. A manual for biomaterials/scaffold fabrication technology" World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, v.4 (2007) pp.1-12.
- ² S.V. Madhally, H.W.T. Matthew, "Porous chitosan for tissue engineering" *Biomaterials* 20 (1999) 1133-1142.
- ³ G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, "Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering" *Materials Science and Engineering C* 17 (2001) 63-69.
- ⁴ R.M. Nerem, "In: Principles of tissue engineering - The challenge of imitating nature, Editors: R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti J, Elsevier Academic Press, Burlington, MA (2007) pp.7-14.
- ⁵ H. Wu, Y. Wan, X. Cao, Q. Wu, "Proliferation of chondrocytes on porous poly(DL-lactide)/chitosan scaffolds" *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 76-87.
- ⁶ F. Intraruovo, D. Howard, L.J. White, R.K. Johal, A.M. Ghaemmaghami, P. Favia, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, M.R. Alexander, "Uniform cell colonization of porous 3-D scaffolds achieved using radial control of surface chemistry" *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3336-3344.
- ⁷ J.K. Hong, S.V. Madhally, "Three-dimensional scaffold of electrosprayed fibers with large pore size for tissue regeneration" *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4734-4742.
- ⁸ Y. Wan, C. Tu, J. Yang, J. Bei, S. Wang, "Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly(L-lactide) scaffolds" *Biomaterials* 27 (2006) 2699-2704.
- ⁹ E. Sachlos, J.T. Czernuszka, "Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds" *European Cells and Materials* 5 (2003) 29-40.
- ¹⁰ L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, "Culture of organized cell communities" *Advanced Drug Delivery Reviews* 33 (1998) 15-30.
- ¹¹ W.H. Eaglstein, V. Falanga, "Tissue engineering and the development of Apligraf®, a human skin equivalent" *Clinical Therapeutics* 19 (1997) 894-905.
- ¹² I. Martin, R.F. Padera, G. Vunjak-Novakovic, L.E. Freed, "In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues" *Journal of Orthopaedic Research* 16 (1998) 181-189.
- ¹³ C.A. Léon Y Léon, "New perspectives in mercury porosimetry" *Advanced in Colloid and Interface Science* 76-77 (1998) 341-372.
- ¹⁴ Y.-C. Chiu, M.-H. Cheng, H. Engel, S.-W. Kao, J.C. Larson, S. Gupta, E.M. Brey, "The role of pore size on vascularization and tissue remodeling in PEG hydrogels" *Biomaterials* 32 (2011) 6045-6051.
- ¹⁵ S. Zhong, Y. Zhang, C.T. Lim, "Fabrication of large pores in electrospun nanofibrous scaffolds for cellular infiltration: A review" *Tissue Engineering - Part B: Reviews* 18 (2012) 77-87.
- ¹⁶ S.F. Hulbert, F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert, F.H. Stelling, "Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses" *Journal of Biomedical Materials Research* 4 (1970) 433-456.
- ¹⁷ A.I. Itälä, H.O. Ylänen, C. Ekholm, K.H. Karlsson, H.T. Aro, "Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits" *Journal of Biomedical Materials Research* 58 (2001) 679-683.
- ¹⁸ V. Karageorgiou, D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.

- ¹⁹ Y. Kuboki, H. Takita, D. Kobayashi, E. Tsuruga, M. Inoue, M. Murata, N. Nagai, Y. Dohi, H. Ohgushi, "BMP induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis" *Journal of Biomedical Materials Research* 39 (1998) 190–199.
- ²⁰ M. Svehla, P. Morberg, B. Zicat, W. Bruce, D. Sonabend, W.R. Walsh, "Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures" *Journal of Biomedical Materials Research* (2000) 15-22.
- ²¹ E.J. Harvey, J.D. Bobyn, M. Tanzer, G.J. Stackpool, J.J. Krygier, S.A. Hacking, "Effect of flexibility of the femoral stem on bone- remodeling and fixation of the stem in a canine total hip arthroplasty model without cement" *The Journal of Bone and Joint Surgery* 81 (1999) 93-107.
- ²² H. Yuan, K. Kurashina, J.D. de Bruijn, Y. Li, K. de Groot, X. Zhang, "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics" *Biomaterials* 20 (1999) 1799-1806.
- ²³ K.A. Hing, B. Annaz, S. Saeed, P.A. Revell, T. Buckland, "Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16 (2005) 467-475.
- ²⁴ A. Bignon, J. Chouteau, J. Chevalier, G. Fantozzi, J.-P. Carret, P. Chavassieux, G. Bovin, M. Melin, D. Hartmann, "Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14 (2003) 1089-1097.
- ²⁵ P. Habibovic, H. Yuan, C.M. van der Valk, G. Meijer, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, "3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials" *Biomaterials* 26 (2005) 3565-3575.
- ²⁶ K.A. Hing, S.M. Best, K.E. Tanner, W. Bonfield, P.A. Revell, "Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 68 (2002) 187-200.
- ²⁷ T. Kaito, A. Myoui, K. Takaoka, N. Saito, M. Nishikawa, N. Tamai, H. Ohgushi, H. Yoshikawa, "Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite" *Biomaterials* 26 (2005) 73-79.
- ²⁸ Q.-M. Jin, H. Takita, T. Kohgo, K. Atsumi, H. Itoh, Y. Kuboki, "Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 51 (2000) 491-499.
- ²⁹ J.L. Simon, T.D. Roy, J.R. Parsons, E.D. Rekow, V.P. Thompson, J. Kemnitzer, J.L. Ricci, "Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect" *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66 (2003) 275-282.
- ³⁰ A. Abarrategi, M.C. Gutiérrez, C. Moreno-Vicente, H.J. Hortigüela, V. Ramos, J.L. López-Lacomba, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes" *Biomaterials* 29 (2008) 94-102.
- ³¹ M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Ice-templated materials: sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly" *Chemistry of Materials* 20 (2008) 634-648.
- ³² S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 27 (2006) 5480-5489.
- ³³ T. Fukasawa, Z.Y. Deng, M. Ando, T. Ohji, Y. Goto, "Pore structure of porous ceramics synthesized from water-based slurry by freeze-dry process" *Journal of Materials Science* 36 (2001) 2523-2527.
- ³⁴ H.-W. Kang, Y. Tabata, Y. Ikada, "Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering" *Biomaterials* 20 (1999) 13339-1344.
- ³⁵ M.C. Gutiérrez, Z.Y. García-Carvajal, M. Jobbágy, F. Rubio, L. Yuste, F. Rojo, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Poly(vinyl alcohol) scaffolds with tailored morphologies for drug delivery and controlled release" *Advanced Functional Materials* 17 (2007) 3505-3513.

**IX. ELECTRODEPOSICIÓN EN FLUJO DE FOSFATO
DE CALCIO SOBRE SOPORTES DE NANOTUBOS DE
CARBONO PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO**

9.1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de lesiones óseas derivadas de fracturas, resección de tumores y osteoporosis, es una práctica clínica común que tiene como objetivo la cura y reparación del hueso dañado. A lo largo de la vida del ser humano, el cuerpo es capaz de renovar el esqueleto óseo a partir de un proceso constante de remodelación que incluye formación y degradación de hueso. No obstante, con la edad, estos procesos se distorsionan progresivamente, llegando a suponer una pérdida crítica de masa y densidad ósea. En consecuencia, las funciones biológicas y mecánicas del esqueleto se ven alteradas, apareciendo problemas funcionales asociados que son, en muchos casos, crónicos. Actualmente, sólo en EE.UU., se producen al año más de 6.2 millones de fracturas de hueso, de las cuales aproximadamente el 10% no se cura adecuadamente.¹ Por otra parte, 10 millones de personas están actualmente afectadas por osteoporosis, enfermedad que supone unos costes sanitarios de miles de millones de dólares y cuya incidencia se estima en aumento para las próximas décadas.² Diversos estudios han demostrado que más de la mitad de las enfermedades crónicas en pacientes mayores de 65 años son de tipo reumatólogo y que las fracturas causadas por osteoporosis se han duplicado en la última década, hasta el punto que el 40% de las mujeres de más de 50 años se verán probablemente afectadas por esta dolencia en el futuro. Para el tratamiento de estas condiciones patológicas, se realizan anualmente en el mundo alrededor de 2.2 millones de injertos óseos,³ de los cuales sólo un porcentaje se cubre con trasplantes de hueso autólogo, debido a la baja disponibilidad de tejido sano donante y a la morbilidad asociada en la zona del explante. En este contexto, la Ingeniería de tejidos se presenta como una tecnología alternativa al trasplante para la fabricación de sustitutos que permitan rellenar los defectos del tejido óseo, promoviendo una adecuada cicatrización y reparación funcional del tejido.⁴ En concreto, las aplicaciones ortopédicas y dentales representan actualmente un 50% del total de la demanda de biomateriales en el mercado y se estima un aumento exponencial de las mismas en los próximos años.⁵

9.1.1. EL TEJIDO ÓSEO

Los huesos y dientes son tejidos biomineralizados, biocompuestos con una estructura basada en una matriz orgánica impregnada con cristales orientados de carboxiapatita y cuya función principal es la de dar soporte al resto de tejidos blandos del cuerpo humano y permitir la tracción muscular (Fig. 9.1). Aún siendo un tejido funcionalmente muy especializado, la estructura y composición del hueso varía de forma considerable según la localización en el

organismo, la edad, la alimentación y el historial de enfermedades padecidas. No obstante, en general, el hueso es un *composite* biológico formado por una fase mineral (que representa entre un 60 y un 70% del tejido) y una fase orgánica (22-35%, con un contenido en agua del 5-8%). Esta materia orgánica, a su vez, está constituida en aproximadamente un 90% por colágeno y un 5% por proteínas colágenicas. Los osteoblastos y odontoblastos, respectivamente, son las células responsables de la formación de las matrices óseas y dentales, junto con una mezcla de colágeno tipo I y proteínas no colágenicas especializadas. Los tejidos resultantes exhiben unas propiedades mecánicas extraordinarias, superando incluso las de muchos materiales sintéticos.⁶

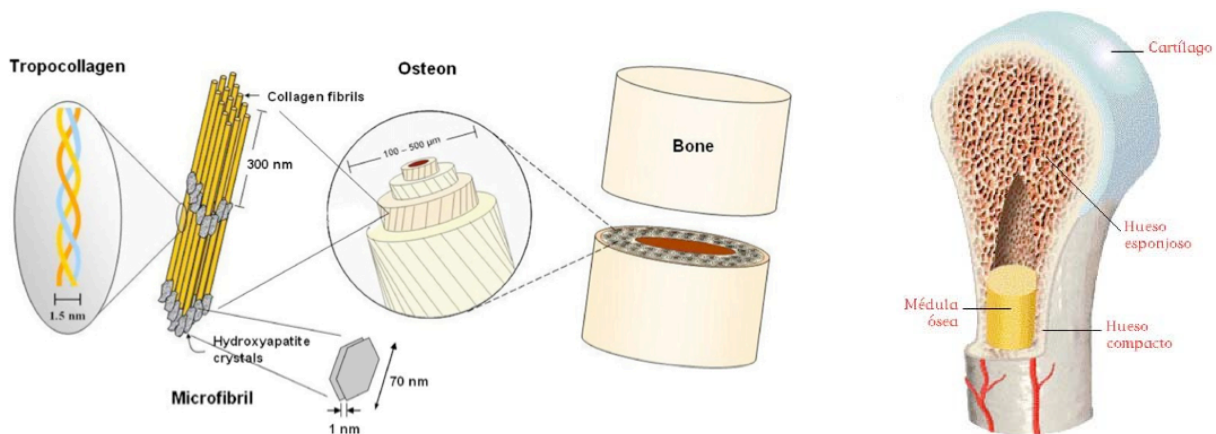


Figura 9.1. Esquema de la estructura jerárquica del tejido óseo en el que se muestra desde las osteonas (unidades funcionales del hueso compacto) hasta las cadenas proteicas del procolágeno a nivel macromolecular.⁷⁻⁸

9.1.2. SOPORTES PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Cuando se pretende reemplazar un tejido enfermo por un sustituto biológico o sintético, con la intención de recuperar la organización y funciones del tejido original, es importante intentar imitar sus propiedades físicoquímicas, estructurales y biológicas.⁹⁻¹⁰

Los materiales sintéticos biomiméticos con propiedades similares a las del hueso son un objetivo difícil de conseguir debido a la enorme complejidad estructural del tejido óseo nativo y su alta especialización. Una de las estrategias más prometedoras para restaurar, mantener y/o mejorar la función del tejido óseo dañado es el diseño de soportes porosos 3D que actúen como plantilla, con una red interconectada de poros y una alta superficie específica susceptible de ser colonizada por células progenitoras de hueso.¹¹⁻¹² La capacidad para preparar soportes porosos destinados a la regeneración de hueso está ampliamente demostrada en la bibliografía.¹³ Por ejemplo, estudios *in vivo* en un modelo de rata han confirmado la formación de tejido óseo de novo sobre la superficie de partículas porosas de hidroxapatita impregnadas de proteína morfogénica de hueso (BMP).¹⁴ Así mismo, el recubrimiento de implantes metálicos de titanio

por de una capa porosa cristalina de hidroxiapatita ha demostrado mejorar la integración ósea de los mismos.¹⁵ En la actualidad existen numerosos métodos de fabricación de *scaffolds* porosos 3D, como son *particulate-leaching*,¹⁶ *phase separation*,¹⁷ *fiber bonding*,¹⁸ *gas foaming*,¹⁹ o *freeze drying*,²⁰ entre otros (ver apartado 1.1.2.4). No obstante, todos tienen la particularidad de presentar un limitado control sobre los aspectos nanométricos de las matrices resultantes, dimensión crítica ésta cuando se pretende mimetizar las características de la matriz extracelular natural (ECM).²¹ Así mismo, el escaso contenido en componente mineral que se puede incorporar en el material compuesto y su atrapamiento dentro de la matriz polimérica suponen una importante limitación añadida, puesto que impide su interacción con las células y, en consecuencia, limita la funcionalidad proporcionada por la presencia de estos componentes inorgánicos.

9.1.3. BIOMINERALIZACIÓN DE SOPORTES POROSOS

La gran demanda de *scaffolds* para Ingeniería de tejido óseo ha promovido el creciente interés por la mineralización biomimética de hidrogeles como matrices para promover el crecimiento celular.²²⁻²³ En estos materiales, el componente orgánico sirve de matriz de nucleación para el mineral inorgánico, por lo que el proceso de nucleación se iniciaría preferentemente en la superficie de contacto entre ambos.²⁴⁻²⁵⁻²⁶ En el tejido óseo nativo, las proteínas en contacto directo con el componente mineral del hueso son las responsables de modular los procesos de mineralización natural, evitando que los iones en disolución se acomplejen y estabilizando las partículas precursoras para que no se aglomeren en la superficie de unión. El componente mineral del hueso humano incluye varios tipos de fosfato de calcio hidratados, siendo el más común la hidroxiapatita (HAp), con un porcentaje entorno al 65%. Así, aunque la mayoría del esfuerzo en el campo de la biomineralización se ha dirigido hacia el desarrollo de materiales que contienen HAp, no es desdeñable el número de trabajos en los que se obtienen otras formas cristalinas de fosfato de calcio precursoras de HAp.²⁷⁻²⁸⁻²⁹

En la actualidad, está ampliamente aceptado que la presencia de fosfato de calcio en biomateriales para Ingeniería de tejido óseo mejora significativamente su integración en el tejido nativo. La presencia de este componente mineral sirve, además, como soporte conductor para la maduración de las células que forman parte del hueso. En este sentido, por ejemplo, estudios de biocompatibilidad en soportes poliméricos con nanotubos de carbono mineralizados han demostrado una adecuada adhesión y proliferación celular,³⁰⁻³¹ así como una positiva

diferenciación celular hacia fenotipos de hueso más maduros (e.g. osteoblastos maduros y osteocitos).³²⁻³³

A pesar de las dificultades en la preparación de sustitutos de tejido óseo,³⁴ el enfoque biomimético está ganando mucha atención.³⁵ Particularmente, la mineralización de soportes preformados se presenta como una alternativa muy interesante para la mineralización de superficies.³⁶⁻³⁷ La posibilidad de controlar el componente mineralizado, en términos de grosor y homogeneidad, hace que este enfoque sea especialmente atractivo para recubrir sustratos en dos dimensiones, independientemente de su composición química. Sin embargo, la posibilidad de depositar una capa homogénea de mineral en la superficie interna de un soporte de tres dimensiones (3D) no es trivial, debido a la difícil difusión de cualquier tipo de materia a través de la estructura 3D.³⁸ En concreto, el crecimiento de cristales puede ser más rápido que la difusión de las sales a lo largo de la estructura, de modo que los cristales más grandes crecen a expensas de los más pequeños, según el proceso de maduración de Ostwald, comprometiendo así la homogeneidad de la mineralización del *scaffold*.³⁹⁻⁴⁰

9.1.4. MINERALIZACIÓN MEDIANTE ELECTRODEPOSICIÓN

Recientemente, la electrodeposición se ha propuesto como una alternativa de interés para los procesos de mineralización. De forma semejante a la electrolisis convencional, se puede emplear este método para la deposición de capas de fosfato de calcio sobre sustratos metálicos basándose en la reducción catódica del agua. Ésta induce un aumento local del pH que puede ser aprovechado para la precipitación de los iones de calcio y fosfato presentes en la disolución, logrando así la formación de una capa insoluble y adherente de fosfatos de calcio sobre la superficie del cátodo (Fig. 9.2).⁴¹⁻⁴²

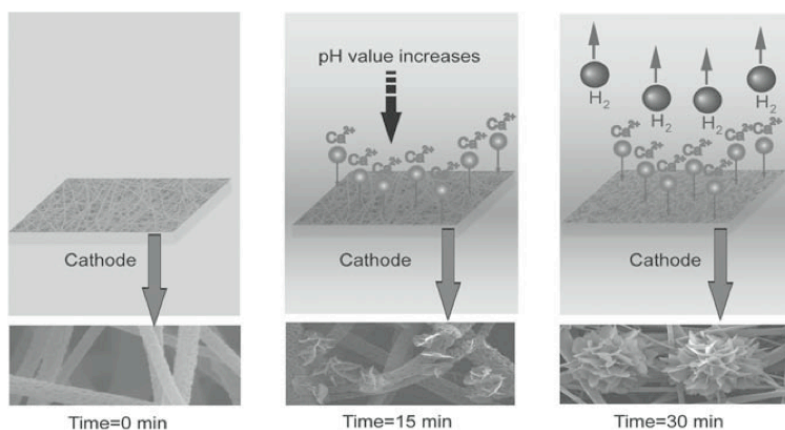


Figura 9.2. Esquema del mecanismo de formación de cristales de fosfato de calcio mediante electrodeposición.⁴³

La morfología, composición, espesor y características estructurales del recubrimiento formado dependen de diversos factores, entre los que se encuentran la temperatura del electrolito, el potencial aplicado, el tiempo de electrodeposición, el grado de agitación, así como la concentración, composición y pH de la solución del electrolito. La deposición electroquímica puede seguir dos secuencias diferentes: la formación inicial de una capa de óxido anódica con incorporación de Ca y P y posterior recubrimiento de hidroxiapatita, o bien la formación directa del recubrimiento sobre el sustrato metálico que actúa como cátodo, siendo ésta la más utilizada. Los recubrimientos de HAp obtenidos por deposición catódica directa sobre el sustrato muestran, en general, una baja concentración de tensiones en la interfase, alta cristalinidad, pureza y homogeneidad. En este caso, el tipo de fase de fosfato de calcio depositado depende de la elección adecuada de los diferentes parámetros electroquímicos. Como principal ventaja, este método ofrece un procedimiento relativamente sencillo para obtener recubrimientos homogéneos y uniformes sobre implantes de formas irregulares y complicadas, con un buen control sobre la cristalinidad del depósito, su espesor y su composición.⁴⁴ Como desventaja, destaca el aumento de la resistencia de la celda electrolítica durante el proceso de deposición, factor que limita el espesor del recubrimiento. Además, el hidrógeno que se desprende en forma de burbujas puede contribuir al desorden de las capas. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para obtener recubrimientos de apatita en distintos sustratos, desde metálicos (como acero inoxidable, titanio y sus aleaciones)⁴⁵ hasta cerámicos (p.e. TiO_2)⁴⁶ o poliméricos.⁴⁷ Todos estos ejemplos revelan el éxito de las técnicas de electrodeposición para la mineralización de sustratos en 2D, e incluso 3D, donde la tercera dimensión está entorno a unas pocas micras.⁴⁸ Sin embargo, la correcta aplicación de estas técnicas para la mineralización de la estructura interna de verdaderos *scaffolds* 3D, en los que la tercera dimensión es equiparable en tamaño a las otras dos, es todavía un reto.⁴⁹

9.1.5. SOPORTES 3D DE CNTs BIOMINERALIZADOS

En los últimos años se ha demostrado la eficacia de *scaffolds* de nanotubos de carbono como filtros y soportes de membranas catalíticas,⁵⁰ sensores de vapor y presión,⁵¹ aerogeles fluorescentes,⁵² soportes conductores,⁵³⁻⁵⁴ y biomateriales,⁵⁵ entre otros. En este trabajo, se presenta un estudio de mineralización de estructuras tridimensionales porosas compuestas por nanotubos de carbono para aprovechar su capacidad como electrodos y biomateriales. Los soportes mineralizados resultantes pretenden mimetizar tanto la estructura como la composición del tejido óseo, facilitando así el proceso de recuperación de dicho tejido, al

proporcionar la materia prima (calcio y fósforo) para la reconstrucción ósea. Esta mineralización se consigue mediante electrodeposición con el fin de obtener un recubrimiento homogéneo de cristales de fosfato de calcio sobre la estructura interna de los soportes 3D, compuestos por nanotubos de carbono (MWCNTs) y quitosano. Los *scaffolds* se obtienen mediante proceso ISISA (ver apartado 3.2.2.3.2)⁵⁶ a partir de una solución acuosa ácida de quitosano donde se dispersan los MWCNTs.⁵⁷ En estos soportes, los MWCNTs actúan como ladrillos proporcionando propiedades conductoras y estructurales, mientras que el quitosano, componente orgánico biocompatible, actúa como agente dispersante y contribuye al refuerzo de la estructura. Sobre estos soportes, se llevan a cabo experimentos de electrodeposición, tanto en condiciones estáticas como en flujo - empleando los *scaffolds* como cátodos en la celda electrolítica - y se caracteriza la morfología y composición de los depósitos obtenidos. Por último, se estudia el comportamiento de osteoblastos humanos Saos-2 en cultivos sobre los *scaffolds* mineralizados con el fin de evaluar la potencial aplicabilidad de estos materiales como matrices osteoconductoras para el tratamiento y la regeneración del tejido óseo.

9.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS *SCAFFOLDS*

Como se ha comentado anteriormente (ver capítulo 7), mediante aplicación de la metodología ISISA se obtienen estructuras 3D porosas a partir de suspensiones acuosas de quitosano y MWCNTs (Q1W6). El empleo de un sistema de congelado unidireccional y a velocidad controlada (en este caso de 5.9 mm/min) es crítico para obtener una estructura con canales alineados en la dirección de congelación,^{58, 59} como se muestra en la figura 9.3. Por simplificación, los *scaffolds* resultantes se pasan a denominar NTC.

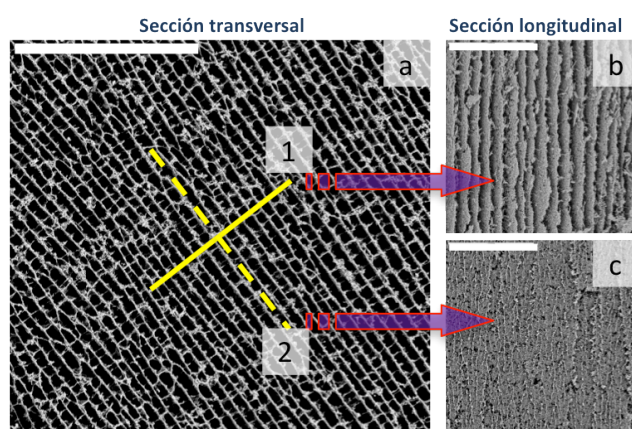


Figura 9.3. Micrografías de SEM de una sección transversal (izquierda) y de dos secciones longitudinales (derecha) a la dirección de congelado de un *scaffold* NTC.

Para reforzar la estructura, los *scaffolds* se exponen a vapores de glutaraldehído (GA), entrecruzando así las cadenas lineales de quitosano entre sí a través de moléculas de GA mediante la formación de bases de Schiff por reacción de adición nucleófila (Fig. 9.4).⁶⁰⁻⁶¹ Tras 24 horas de exposición a vapores de GA a temperatura ambiente se obtienen *scaffolds* estables para la mineralización (de ahora en adelante, *scaffolds* NTCG). En ausencia de entrecruzamiento, la estructura de los soportes se derrumbaría en la disolución acuosa ácida utilizada para la mineralización. Estos monolitos reforzados se dejan al aire durante, al menos, las 24 horas previas al proceso de mineralización con el fin de eliminar así los restos de glutaraldehído que no hubieran reaccionado.

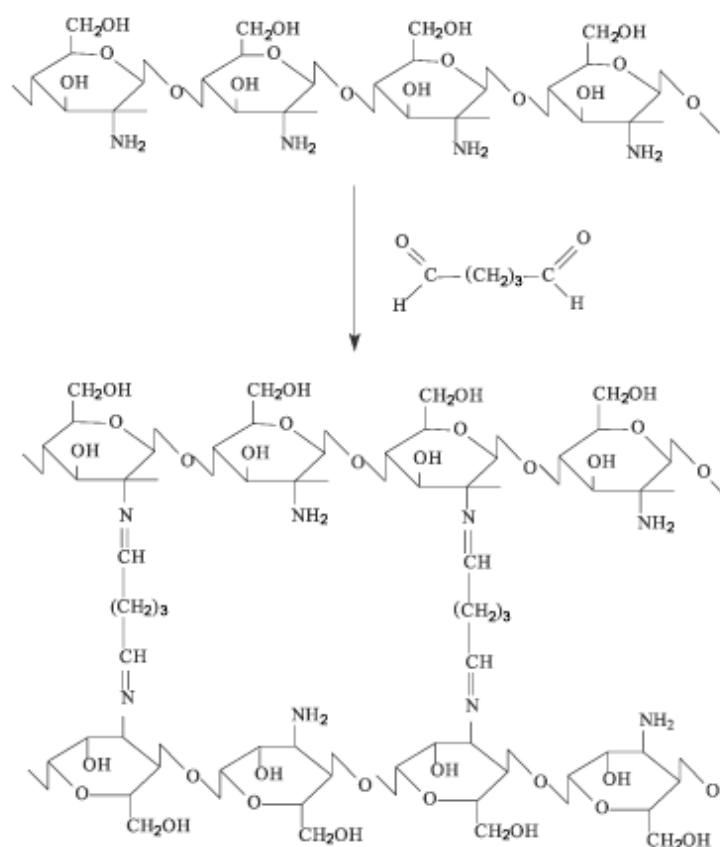


Figura 9.4. Esquema de la reacción de entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con glutaraldehído.

Mediante SEM, y antes del proceso de mineralización, se comprueba que el tratamiento con GA no altera de forma significativa la morfología y estructura de los *scaffolds* (Fig. 9.5).

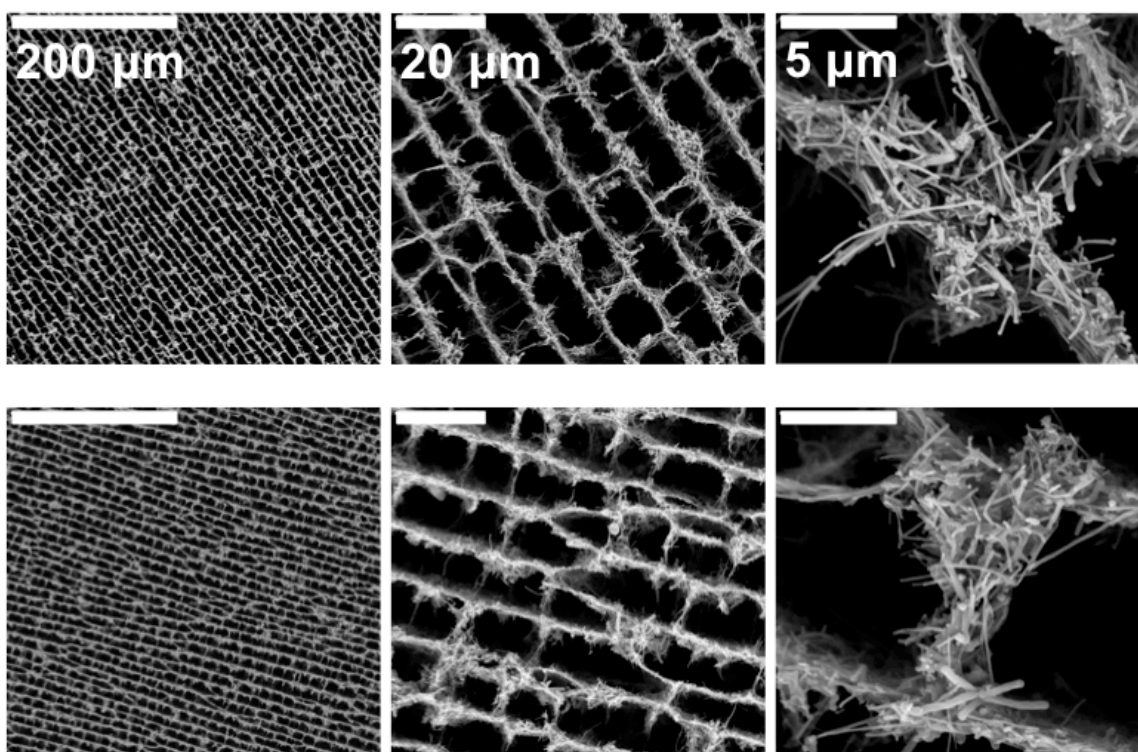


Figura 9.5. Micrografías SEM de secciones perpendiculares a la direcciones de congelación de las matrices NTC (arriba) y NTCG (abajo).

Seguidamente, se realizan estudios de estabilidad térmica mediante TGA. Los termogramas de los soportes NTC y NTCG demuestran que la pérdida de peso del quitosano se lleva a cabo en tres etapas (Fig. 9.6). Las dos primeras etapas se asignan a la pérdida de agua. Una corresponde a la liberación de agua libre y/o ligada a través de enlaces de hidrógeno y la otra se puede atribuir a la liberación de agua más fuertemente unida a través de interacciones polares con grupos hidrófilos (la pérdida de peso para estas dos etapas oscila entre el 1.5 y 2%). La tercera etapa, donde la pérdida de peso está alrededor del 10%, se atribuye a la descomposición del quitosano.⁶²⁻⁶³

Además, se observa que, en el *scaffold* NTCG, la presencia del agente entrecruzante (GA) tiende a desplazar hacia valores más bajos la temperatura a la que ocurre la máxima velocidad de descomposición (de 298 °C a 290 °C), lo que indica una disminución en la estabilidad térmica de los *scaffolds* NTCG respecto a NTC. Este comportamiento se debe probablemente a la formación de enlaces C=N, ya que las bases de Schiff formadas son térmicamente menos estables que el quitosano no modificado.⁶⁴ El entrecruzamiento del quitosano queda, por lo tanto, verificado por el cambio en la estabilidad térmica de los soportes.

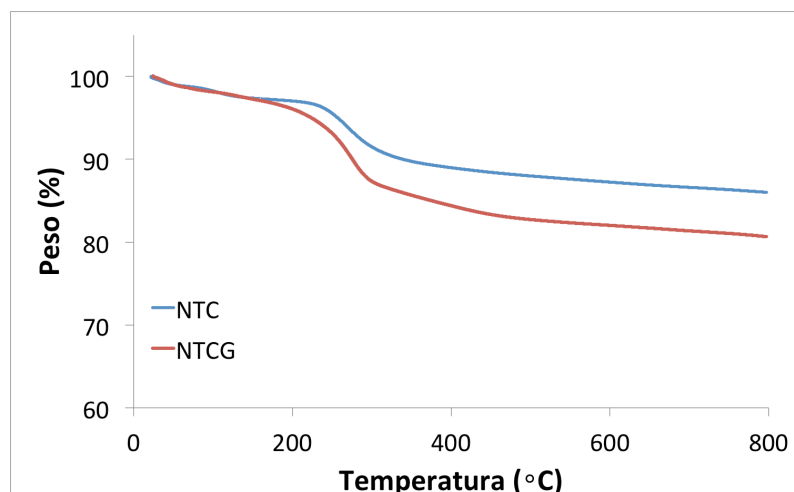


Figura 9.6. Termogramas mediante TGA de *scaffolds* NTC (azul) y NTCG (rojo).

Dos de las principales características que debe mostrar un electrodo son una elevada área superficial y una buena conductividad. La estructura de canales de los *scaffolds* NTC y NTCG proporciona una gran área superficial interna, por lo que resta comprobar su conductividad.

Algunas propiedades físicas de los *scaffolds* NTC y NTCG se resumen en la [tabla 9.1](#). Como era de esperar, no se observan variaciones significativas en la porosidad de los soportes, entrecruzados y sin entrecruzar. Sin embargo, el entrecruzamiento favorece una mayor rigidez de las matrices, lo que se manifiesta en una disminución del valor del módulo de Young y de la conductividad.

Tabla 9.1. Propiedades físicas de los *scaffolds* NTC y NTCG.

	<i>Scaffold</i> NTC	<i>Scaffold</i> NTCG
Porosidad (%)	79.5	78.8
Grado de hinchamiento (%)	93.1	92.2
Módulo de Young (MPa)	5.0	2.5
Conductividad (S/cm)	2.5	1.8

Considerando que el empleo de estos soportes como biomateriales prevé experimentos en disoluciones acuosas, también se ha estudiado el grado de hinchamiento de los *scaffolds* en tampón fosfato (PBS, 0.1M pH=7.4) a 37 °C. Los perfiles de hidratación obtenidos ([Fig. 9.7](#)) muestran que los dos tipos de soportes, NTC y NTCG, alcanzan su valor de hinchamiento máximo (o de equilibrio) en los primeros 5 minutos y este valor se mantiene estable en el tiempo. La insolubilidad del quitosano en agua es la responsable de que el perfil de hidratación

del *scaffold* sin entrecruzar (NTC) coincide con el del *scaffold* entrecruzado (NTCG). Mediante estudios de SEM se comprueba la estabilidad estructural de los soportes entrecruzados y sin entrecruzar después de su hidratación en PBS durante 4 horas (Fig. 9.8). Con respecto a las propiedades mecánicas, tampoco se observan variaciones significativas en el valor del módulo de Young entre los soportes antes y después de su hidratación en PBS, tanto para NTC como para NTCG. Éste es, sin duda, un aspecto de gran importancia, dado que la aplicación biológica de estos materiales supondrá su interacción con soluciones acuosas de pH neutro.

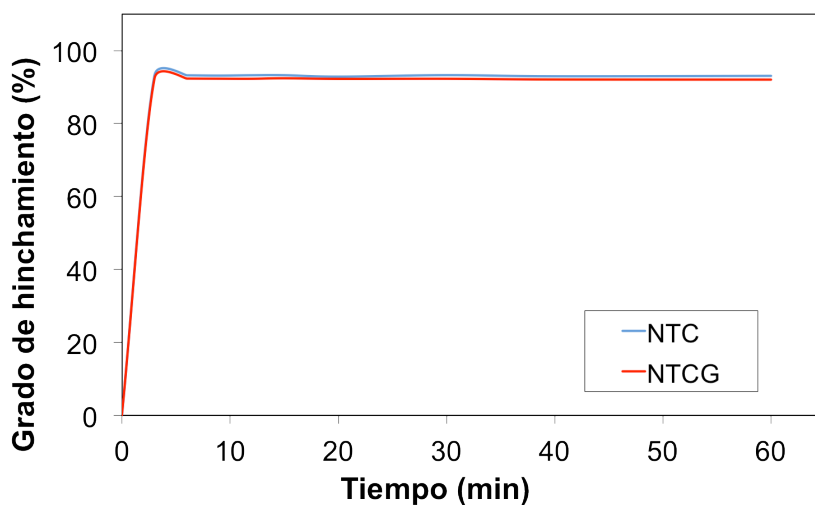


Figura 9.7. Perfiles de hidratación de *scaffolds* NTC (azul) y NTCG (rojo) en PBS (0.1M pH=7.4) a 37 °C.

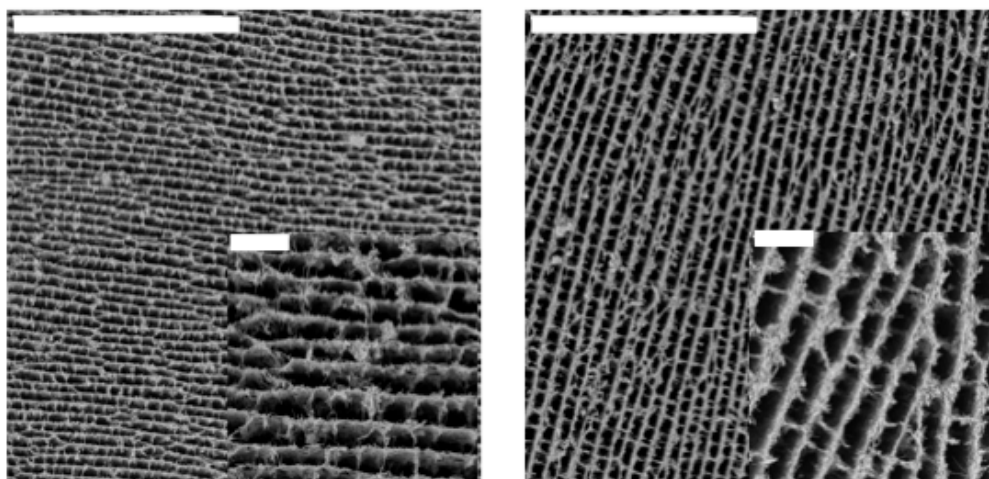


Figura 9.8. Micrografías de SEM de secciones perpendiculares a la dirección de congelación de matrices NTC (izquierda) y NTCG (derecha) después del hinchamiento en PBS (0.1M; pH=7.4) durante 4 horas a temperatura ambiente. Las barras de escala representan 200 μm (imagen grande) y 20 μm (imagen pequeña).

Por otro lado, el valor de la conductividad para las matrices hidratadas resulta ser más bajo.⁶⁵ En particular, se obtiene que la matriz NTC hidratada presenta un valor de conductividad de 0.8 S/cm, mientras que en la matriz NTCG hidratada se obtiene un valor de 1.2 S/cm. Con respecto a los valores de los mismos soportes no hidratados ([tabla 9.1](#)), se observa una notable disminución del valor de conductividad, sobretodo en el caso del *scaffold* no entrecruzado. La disminución de conductividad en muestras hidratadas se puede explicar por el aumento de la resistencia del electrolito. Por otro lado, el entrecruzamiento de los *scaffolds* NTCG disminuye el hinchamiento, favoreciendo así el mantenimiento de la conductividad de los nanotubos.

9.3. MINERALIZACIÓN MEDIANTE ELECTRODEPOSICIÓN

La técnica de electrodeposición se basa en el uso de los siguientes elementos: una celda electrolítica, un cátodo, un ánodo y un electrolito que actúa como conductor iónico y que contiene los elementos que se quieren depositar. Además, se necesita una fuente de potencial externa a la cual estarán unidos los electrodos por medio de conductores eléctricos y que es capaz de generar la diferencia de potencial necesaria para llevar a cabo la deposición.

A pesar de que el mecanismo que regula la mineralización todavía no se entiende por completo, generalmente se acepta que las reacciones electroquímicas (principalmente la reducción del agua) dan como resultado un aumento local del pH en las proximidades del cátodo. Como consecuencia, la sobresaturación de las sales de fosfato de calcio - como la hidroxiapatita (HAp), el fosfato octacálcico (OCP) y el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) - determina la deposición de estas sales sobre la superficie del cátodo.

9.3.1. PREPARACIÓN DEL ELECTRODO 3D

En este trabajo de tesis, la electrodeposición se realiza bajo condiciones potencioestáticas empleando una celda electroquímica de tres electrodos. Se emplea un *scaffold* cilíndrico NTCG (de 4.5 mm de diámetro y 12 mm de altura) como electrodo de trabajo, un electrodo Ag/AgCl como sistema de referencia y una malla de platino como contra-electrodo ([ver apartado 3.2.3.1](#)). En particular, la malla de platino se pliega alrededor del *scaffold* NTCG para acoger a la matriz con el objetivo de producir un aumento local de la concentración de los iones hidroxilo y favorecer la deposición de sales de fosfato de calcio justo sobre la matriz.⁴⁹

En la [figura 9.9](#) se muestra la configuración de la celda electrolítica usada en los experimentos de electrodeposición. El montaje del *scaffold* NTCG sobre el tubo de vidrio, sellado mediante el uso de un tubo termoretráctil, permite el flujo del electrolito a lo largo de la estructura porosa de microcanales, mientras que la presencia de un hilo de carbono conectado a la matriz NTCG actúa como colector de corriente y permite aplicar el voltaje requerido para la electrodeposición.⁶⁶

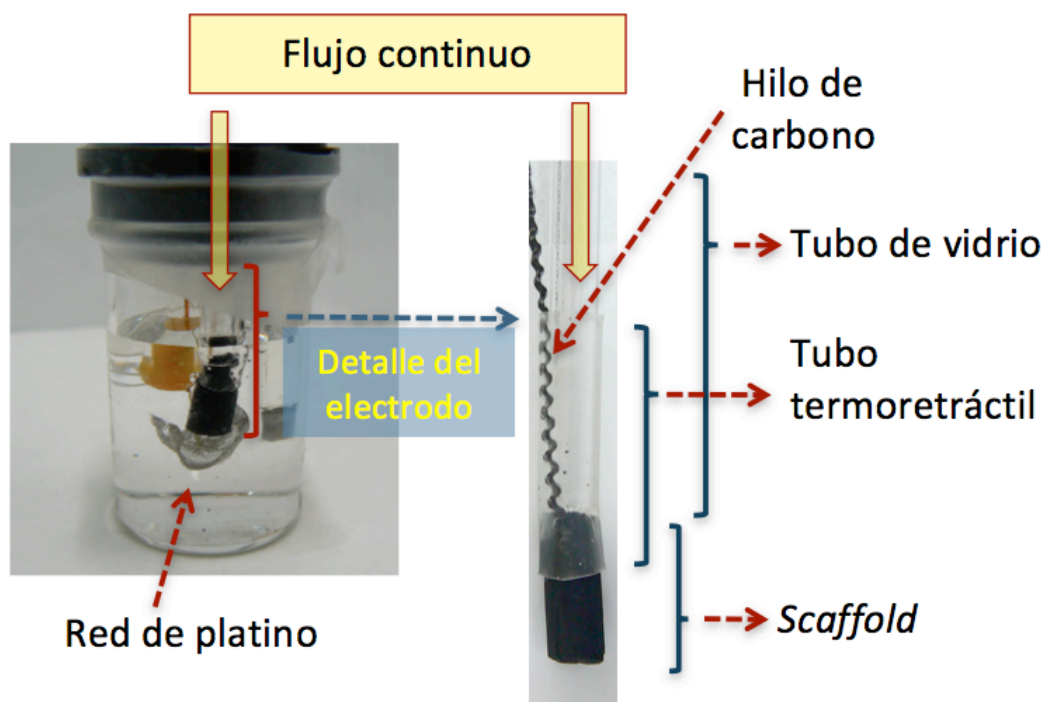


Figura 9.9. Esquema de la celda electrolítica usada en los experimentos de electrodeposición (izquierda) y detalle del montaje del cátodo 3D usado para la electrodeposición en flujo (derecha).

9.3.2. MINERALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS

Los primeros experimentos de electrodeposición se realizan durante 30 min a 30 °C y 1.4 V, con una disolución electrolítica⁶⁷ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 20mM, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 12 mM y NaNO_3 0.1M. En ausencia de flujo, las micrografías SEM del *scaffold* mineralizado resultante (NTCGM) revelan que la precipitación de cristales no presenta una distribución homogénea sobre la superficie interna de la matriz ([Fig. 9.10](#)). Así, se observan agregados cristalinos de mayor tamaño en la superficie más próxima al borde del cilindro, mientras que el tamaño de los agregados disminuye (llegando prácticamente a desaparecer) en la parte más interna de la superficie del monolito.

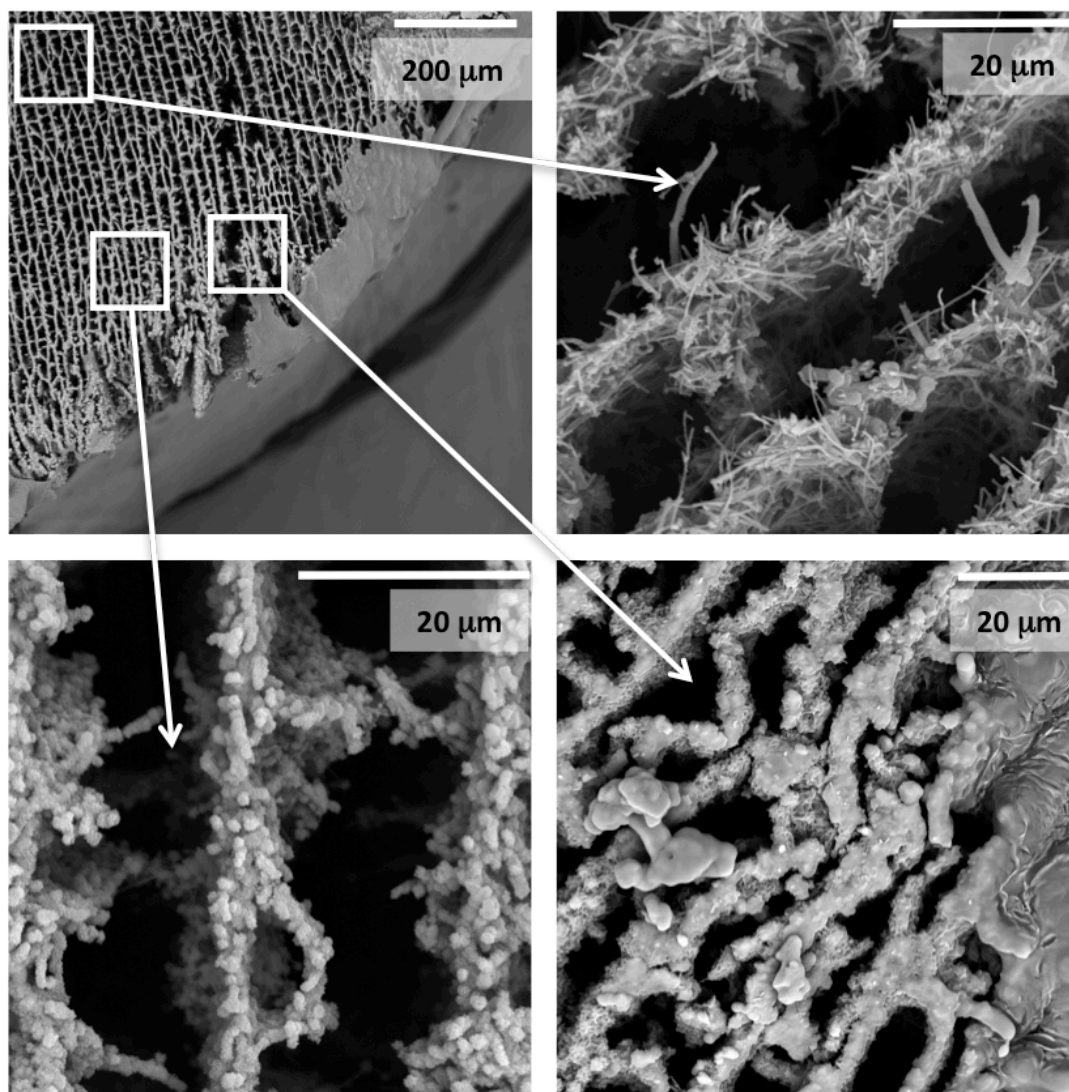


Figura 9.10. Micrografías de SEM de distintas partes de la superficie interna del *scaffold* NTCGM después de la mineralización en condiciones estáticas (sin flujo).

La heterogeneidad radial no se observa cuando la electrodeposición se lleva a cabo en la configuración de flujo continuo. En este caso, la capa homogénea de los agregados cristalinos se extiende sobre toda la estructura interna del cátodo. La [figura 9.11](#) muestra una sección transversal de un *scaffold* NTCGM en el que una capa homogénea de cristales cubre una superficie de aprox. $0.9 \times 0.9 \text{ mm}^2$ que se extiende desde la periferia hacia el interior del centro del cilindro. Además, el recubrimiento homogéneo de la estructura interna de la muestra se observa también a lo largo de una sección longitudinal del soporte ([Fig. 9.12](#)), indicando la homogeneidad completa del recubrimiento obtenido.

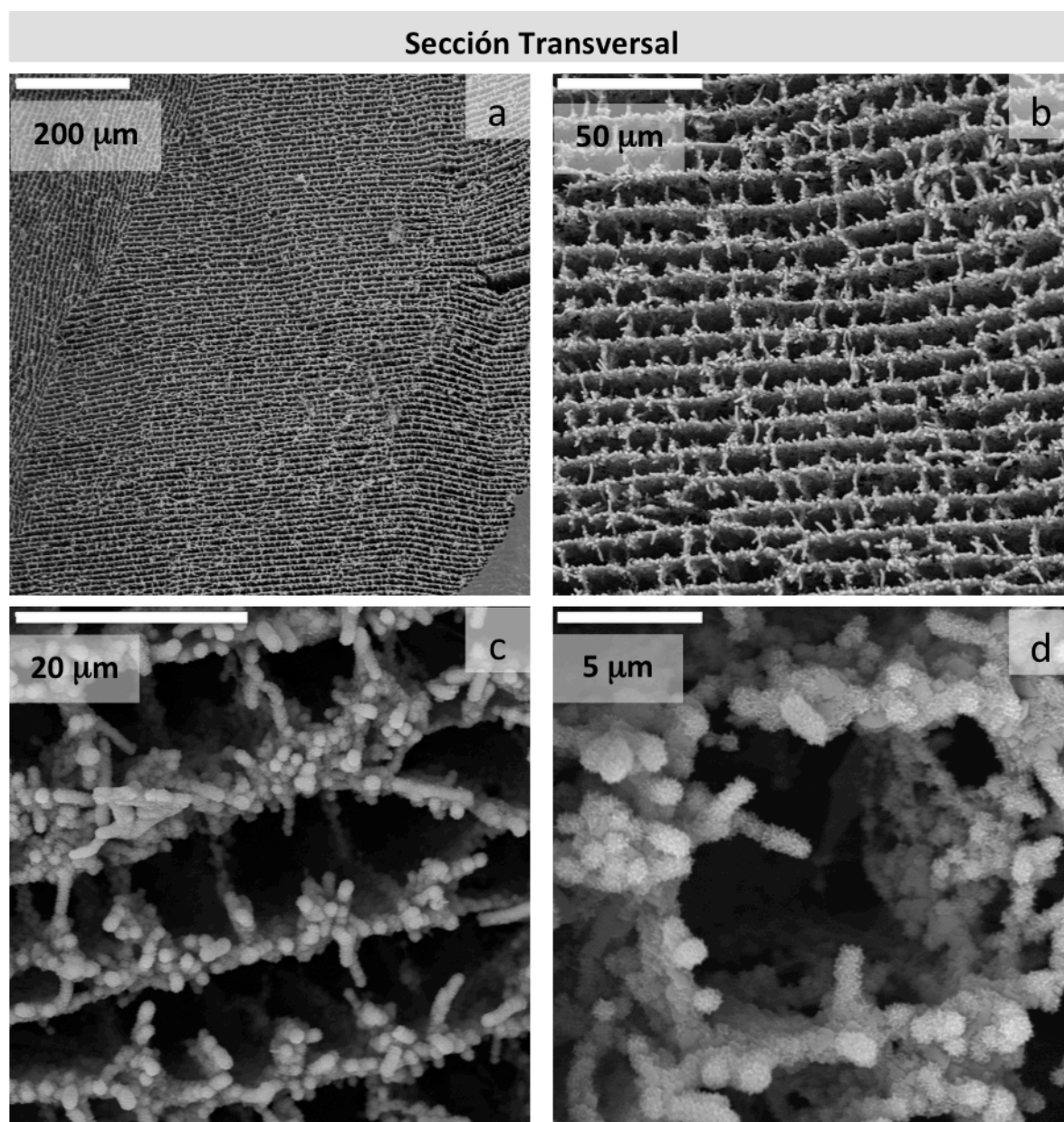


Figura 9.11. Micrografías de SEM de *scaffolds* NTCGM después de la mineralización en flujo (30 min, 30 °C y 1.4V) que revelan la homogeneidad radial de la electrodeposición de los cristales de fosfato de calcio sobre toda la superficie del *scaffold*.

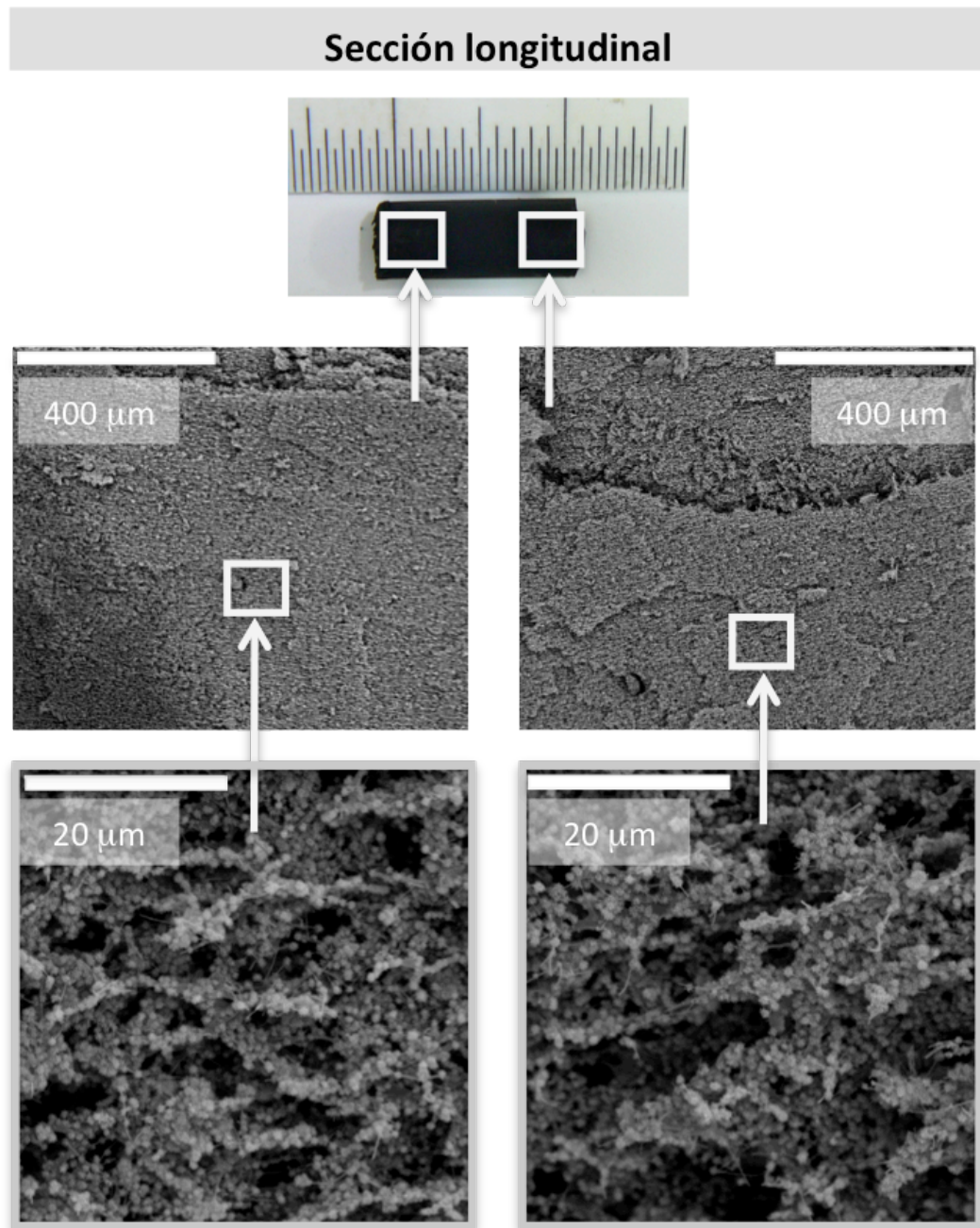


Figura 9.12. Micrografías de SEM de *scaffolds* NTCGM después de la mineralización en flujo (30 min, 30 °C y 1.4V) que revelan la homogeneidad de la electrodeposición de los cristales de fosfato de calcio a lo largo de una sección longitudinal del *scaffold*.

La obtención de recubrimientos homogéneos en las electrodeposiciones llevadas a cabo aumentando del tiempo de aplicación y/o utilizando diferentes temperaturas y voltajes, confirma la necesidad de una alimentación continua de la disolución del electrolito, proporcionada mediante la aplicación de flujo a través del electrodo de trabajo, y pone de manifiesto la universalidad de esta metodología para la mineralización de un *scaffold* 3D (Fig. 9.13).

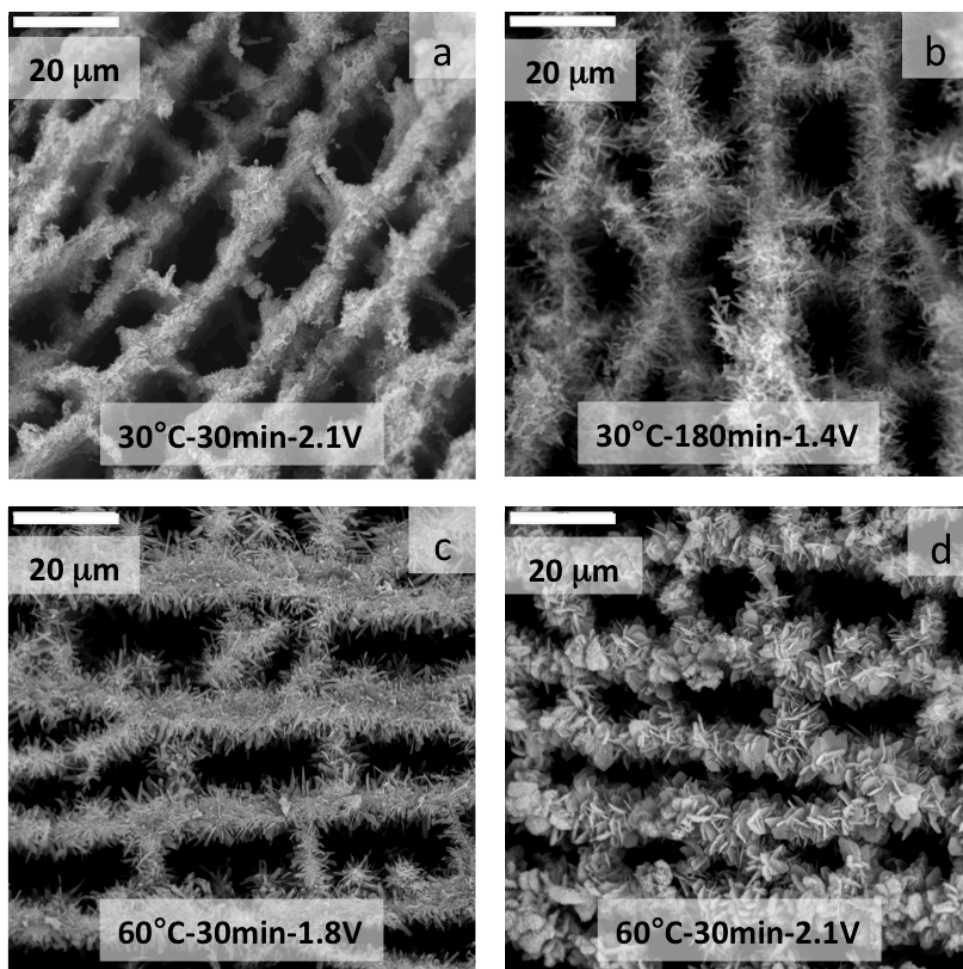


Figura 9.13. Micrografías de SEM de *scaffolds* NTCGM después de la mineralización en flujo en distintas condiciones que revelan la homogeneidad de la capa cristalina formada independientemente de las condiciones experimentales utilizadas para la electrodeposición; (a) 30°C-30 min-2.1V, (b) 30°C-180min-1.4V, (c) 60°C-30 min-1.8V y (d) 60°C-30min 2.1V.

Como la naturaleza cristalina del mineral depositado sobre el *scaffold* varía dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas para la electrodeposición, a continuación se estudia la naturaleza de los cristales depositados mediante difracción de rayos-X (Fig. 9.14). En todos los casos, los espectros DRX presentan los principales picos característicos para los CNTs en ángulos de $2\theta=26.5^\circ$ y 54.3° .⁶⁸ El patrón de difracción de rayos X del recubrimiento cristalino electrodepositado durante 30 min a 30 °C y 1.4V presenta un pico a $2\theta = 11.7^\circ$ que, de acuerdo con la ficha JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*), corresponde a DCPD (ficha JCPDS 09-0077) (Fig. 9.14-a). El patrón SAED de difracción de electrones, realizado mediante TEM, para los cristales de DCPD resulta coherente con el patrón de difracción de rayos X. Así, los índices de los planos de las reflexiones (020), (021), (041), (221) y (220) se observan a las distancias de los planos cristalográficos de los anillos de difracción $d_{020}=0.771$

nm, $d_{021}=0.399$ nm, $d_{041}=0.306$ nm, $d_{221}=0.289$ nm, y $d_{220}=0.254$ nm (Fig. 9.15-a). También se estudia la matriz mineralizada cuando la electrodeposición se realiza durante 30 min a 60 °C (en lugar de 30 °C) y 1.4 V (Fig. 9.14-b). El patrón de difracción de rayos X muestra dos picos en $2\theta = 9.4^\circ$ (débil) y 4.7° (muy intenso) que corresponden a OCP (ficha JCPDS 26-1056). Los picos atribuidos a OCP también se observan cuando la electrodeposición se realiza durante 180 min a 30 °C y 1.4 V (Fig. 9.14-a), aunque su intensidad es menor que la observada en el caso anterior. En este caso (30 °C-180min-1.4 V), la intensidad del grupo de picos centrados en $2\theta = 31.7^\circ$ también exhibe un cierto aumento que revela la aparición de HAp (ficha JCPDS 09-0432) como componente minoritario (Fig. 9.14-a). La intensidad de los picos atribuidos a OCP (a $2\theta = 9.4^\circ$ y 4.7°) también disminuye cuando la mineralización se prolonga en el tiempo durante 180 minutos a 60 °C y 1.4 V. En este caso, se observa paralelamente el aumento de la intensidad del pico a $2\theta = 31.7^\circ$, que confirma una presencia importante de HAp (Fig. 9.14-b).

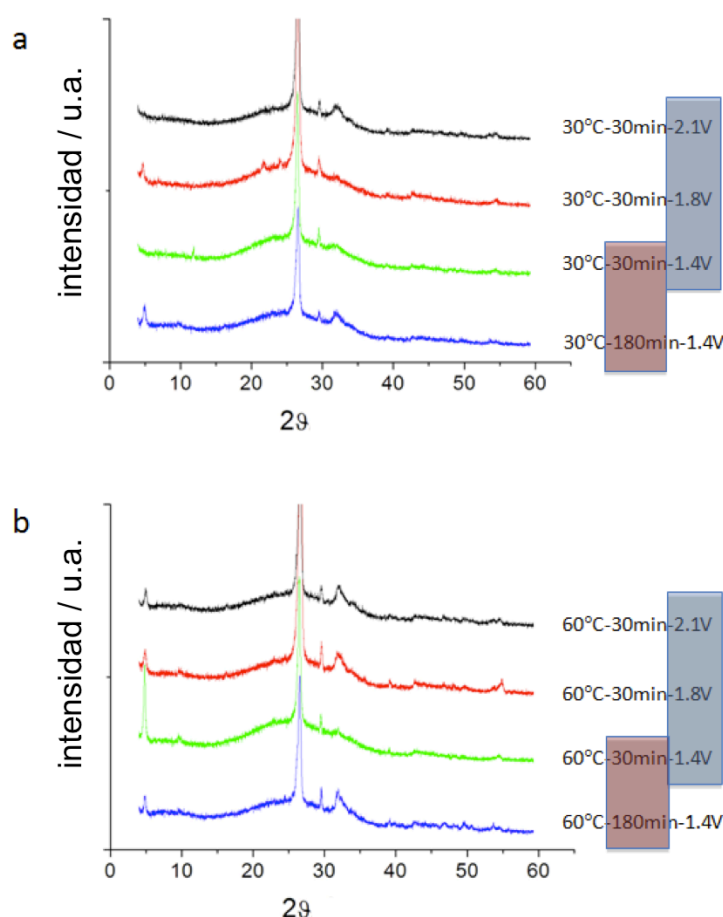


Figura 9.14. Diagramas DRX de *scaffolds* NTCGM después de mineralización en flujo en diferentes condiciones experimentales de electrodeposición: (a) 30 °C durante 30 minutos a 1.4 (curva verde), 1.8 (roja) y 2.1V (negra) y 30 °C durante 180 minutos a 1.4V (azul); (b) 60 °C durante 30 minutos a 1.4 (verde), 1.8 (roja) y 2.1V (negra) y 60 °C durante 180 minutos a 1.4V (azul).

Por último, el aumento del voltaje aplicado desde 1.4V hasta 2.1V da lugar a la transición de DCPD a HAp a través de OCP como intermedio para las electrodeposiciones llevadas a cabo a 30 °C durante 30 min (Fig. 9.14-a), mientras que a 60 °C (y durante 30 min) OCP es la fase principal observada en todos los voltajes aplicados (Fig. 9.14-a). Cabe señalar que la adecuada selección de las condiciones experimentales utilizadas para la electrodeposición favorece la deposición de fases cristalinas de alta pureza de DCPD, OCP y HAp (30 min-30 °C-1.4 V, 30 min-60 °C-1.4V y 30 min-30 °C-2.1V, respectivamente).

Las micrografías de SEM (Fig. 9.11 y Fig. 9.13) y TEM (Fig. 9.15) muestran que la morfología de los cristales que se forman por electrodeposición se corresponde con las diferentes fases cristalinas observadas en los patrones de difracción de rayos X.

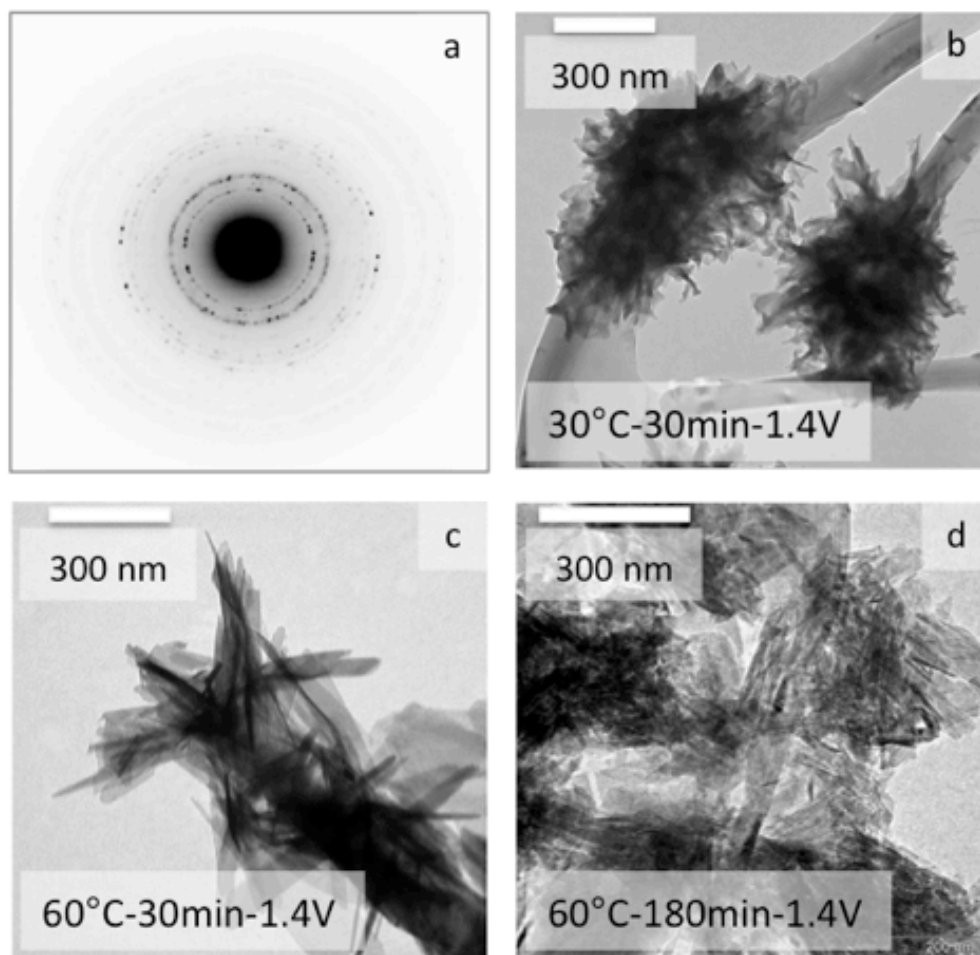


Figura 9.15. Patrón SAED de *scaffolds* NTCGM después de la mineralización en flujo a 30 °C-30min-1.4 V (a). Las micrografías de TEM revelan la diferente morfología de los cristales depositados en función de las condiciones experimentales utilizadas para la electrodeposición: (b) 30 °C-30 min-1.4V, (c) 60 °C-30 min-1.4V, y (d) 60 °C -180min-1.4V.

Así, los cristales de DCPD obtenidos por electrodeposición durante 30 min a 30 °C y 1.4 V muestran una morfología con aspecto parecido a “flores”, compuestos de pequeñas láminas (Fig. 9.11-d y Fig. 9.15-b). Por otro lado, los cristales de OCP obtenidos por electrodeposición durante 30 min a 60 °C y 1.4 V muestran un borde afilado en forma de placa y un tamaño de láminas mayor que el de los cristales de DCPD, con formación de “flores” más grandes que pueden ser organizadas (Fig. 9.13-d) o desorganizadas (Fig. 9.13-b/c y Fig. 9.15-c). Finalmente, la morfología de los cristales de HAp obtenidos tras electrodeposición durante 180 min a 60 °C y 1.4 V es de tipo “agujas” (Fig. 9.15-d).

El análisis EDX (Fig. 9.16), efectuado mediante TEM, sobre las tres muestras que aparecen en la figura 9.15 proporciona las relaciones Ca:P para las distintas formas cristalinas encontradas, es decir DCPD, OCP y HAp, y que son 1.11, 1.27 y 1.45, respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los valores teóricos 1.0, 1.33 y 1.66, considerando que sus fórmulas moleculares son, respectivamente, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para DCPD, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para OCP y $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para HAp. Se observa que la relación Ca:P encontrada para HAp es más baja que el correspondiente valor teórico esperado. Esta diferencia podría ser atribuida a la presencia de algunos cristales remanentes de OCP⁶⁹ que, como se puede observar en su correspondiente patrón de DRX, aún no han sido totalmente convertidos en HAp en las condiciones particulares utilizadas para la electrodeposición (180 min, a 60 °C y 1.4 V).

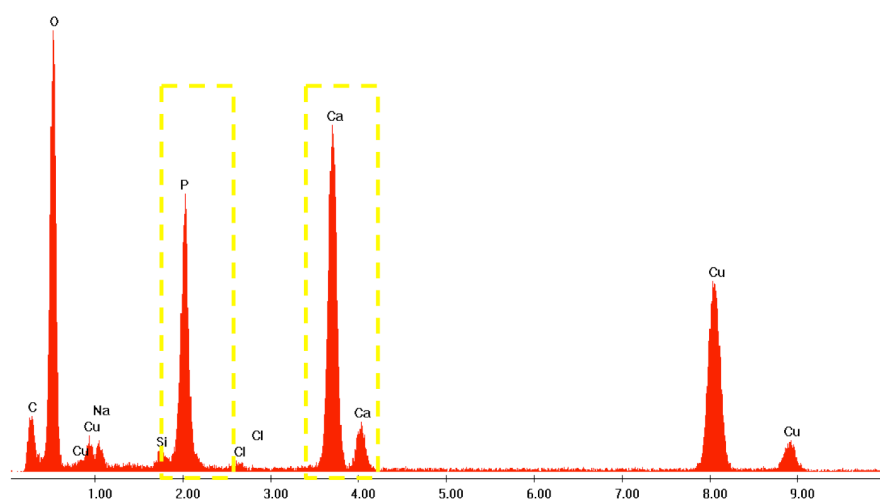


Figura 9.16. Imagen de microanálisis EDX mediante TEM de la muestra NTCGM (30min-30°C-1.4V).

Tanto DCPD que OCP se consideran fases precursoras de HAp. En particular, OCP se ha postulado como la fase precursora de apatita biológica en los huesos y dientes.⁷⁰ En general, se considera que la transición de DCPD a OCP hasta la fase más estable de HAp se produce a

consecuencia del cambio de pH ácido a alcalino. En la electrodeposición, el aumento local del pH que tiene lugar en la proximidad del cátodo es responsable de la sobresaturación de los minerales y, por tanto, de su precipitación. Como se ha descrito anteriormente, las condiciones de sobresaturación se pueden conseguir con el aumento de la temperatura y del voltaje, y/o mediante una extensión en el tiempo del proceso de mineralización.

Por último, hay que mencionar que las disoluciones electrolíticas empleadas en la bibliografía para pruebas de electrodeposición de sales de fosfatos de calcio varían enormemente en composición y concentración. En general, estas disoluciones contienen diferentes sales de calcio y fosfato, como CaCl_2 y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ y CaHPO_4 en presencia de NaNO_3 y/o NaF , NaCl , CaCl_2 y K_2HPO_4 , entre otras. En este trabajo también se ha demostrado la universalidad del método de electrodeposición en flujo descrito mediante el uso de distintas disoluciones electrolíticas. Para ello, se repiten los experimentos de mineralización con un electrolito compuesto por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 42 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 25 mM. La concentración de estas sales duplica las utilizadas anteriormente en este trabajo (20 mM y 12 mM, respectivamente), lo que favorece las condiciones de sobresaturación de las especies y, por tanto, una mayor cantidad de masa depositada. Hay que mencionar, no obstante, que para reproducir las condiciones de trabajo habituales se ha introducido NaNO_3 100 mM con el fin de aumentar la fuerza iónica del electrolito sin aumentar la concentración de las especies activas en la electrodeposición y favorecer así el control de la misma.⁷¹ Como se puede observar, para unas condiciones suaves de trabajo (30min-60°C-1.4V) la deposición obtenida es muy efectiva y produce la formación de un recubrimiento muy completo y homogéneo de fosfato de calcio en la superficie del *scaffold* (Fig. 9.17).

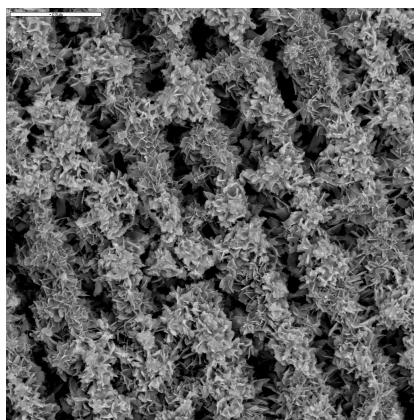


Figura 9.17. Micrografía de SEM de un *scaffold* NTCGM después de la mineralización en flujo (30min-60°C-1.4V) variando la solución de electrolito ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 42 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 25 mM). La barra de escala representa 20 μm .

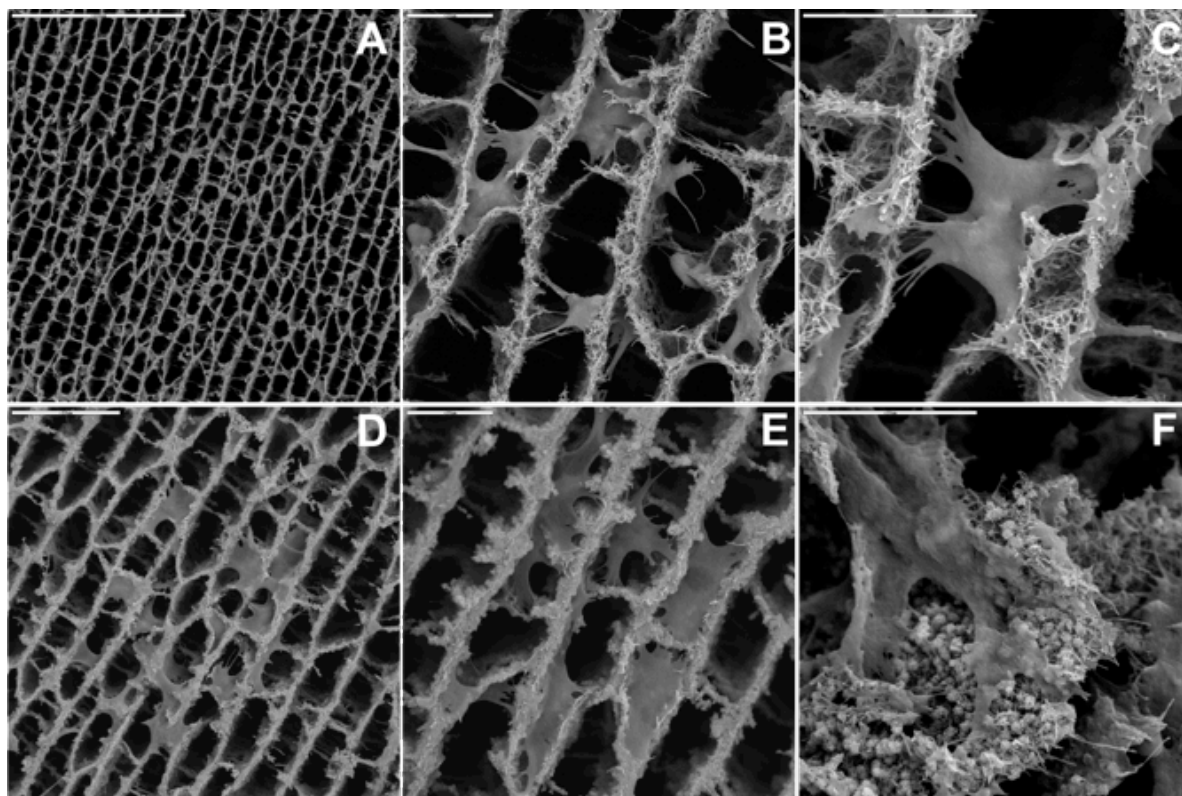
9.4. ESTUDIOS CELULARES

En los apartados precedentes se ha demostrado la capacidad de controlar la formación homogénea de fases cristalinas de alta pureza de fosfato de calcio, en cualquiera de sus formas DCPD, OCP o HAp, apuntando a la electrodeposición como una herramienta fácil para la preparación de diferentes *scaffolds* mineralizados. Teniendo en cuenta que tanto DCPD como OCP son precursores de HAp y que ésta puede mejorar la integración de los biomateriales con el tejido óseo circundante, en este apartado se estudia el comportamiento de osteoblastos humanos Saos-2 en cultivo sobre los soportes mineralizados.⁷²

Para los estudios celulares se ha seleccionado el *scaffold* mineralizado con cristales DCPD debido a que presenta algunas características ventajosas con respecto a los otros *scaffolds* mineralizados obtenidos. En particular, el pequeño tamaño de los cristales formados (menores que los de OCP y HAp) otorga un mayor grado de empaquetamiento y área superficial que los cristales más grandes de OCP y HAp. Además, la rugosidad del recubrimiento de DCPD también es más adecuada para el crecimiento celular (en términos de colonización del sustrato y formación de cultivos confluentes) que la de una superficie recubierta con cristales de OCP o HAp. Los cultivos celulares se realizan en discos de 4.5 mm de diámetro y aproximadamente 3 mm de altura que se obtienen mediante una simple crio-fractura a partir del *scaffold* electrodepositado (4.5 mm de diámetro y 12 mm de altura). De este modo, y gracias a la homogeneidad de la capa mineral que cubre toda la estructura interna del *scaffold*, es posible obtener hasta cuatro discos por cada matriz NTCGM electrodepositada.

9.4.1. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD GENERAL

En primer lugar, se procede a investigar la biocompatibilidad de los *scaffolds* fabricados, celular, un paso previo esencial en la evaluación de cualquier biomaterial con potencial aplicación biomédica.⁷³ Inicialmente, se analiza la adhesión celular de osteoblastos humanos Saos-2 sobre *scaffolds* NTCGM. Con el propósito de evaluar el efecto que la mineralización del *scaffold* tiene sobre este proceso celular, se utilizan *scaffolds* NTC como soporte de referencia. Los resultados obtenidos muestran una buena adhesión celular sobre ambos *scaffolds*, NTC y NTCGM (Fig. 9.18). En particular, las células tienden a colonizar la estructura 3D del soporte, penetrando en los microcanales cuando el tamaño de poro es más grande que las dimensiones de las células y el aporte de nutrientes está garantizado.



9.18. Micrografías de SEM representativas de cultivos de osteoblastos humanos Saos-2 sobre *scaffolds* NTC (A-C) y NTCGM (D-F). Se observa cómo las células se extienden sobre los materiales con una clara tendencia a colonizar los microcanales del soporte. Igualmente se confirma la electrodeposición homogénea de los *scaffolds* NTCGM con cristales DCPD (D,E). Las células se adhieren de manera adecuada sobre la superficie electrodepositada con DCPD (F). Las barras de escala representan 200 μm (A), 50 μm (D) y 20 μm (B, C, E, F).

A continuación, se estudia si esta positiva adhesión celular viene acompañada, además, por el mantenimiento de la viabilidad celular del cultivo. Para ello se utiliza una tinción con calceína/homodímero de etidio en la que las células vivas, con membranas intactas, quedan marcadas con fluorescencia verde por la escisión de la calceína en contacto con las esterasas intracelulares. Por el contrario, aquellas células con la membrana comprometida, y por tanto no viables, quedan marcadas en rojo por la fluorescencia del homodímero de etidio intercalado entre los pares de bases nitrogenadas del ADN. Así, las muestras observadas en el microscopio confocal confirman de nuevo la alta colonización celular de los *scaffolds* y una alta viabilidad de los cultivos (Fig. 9.19). Como ya se ha observado mediante SEM, las células colonizan la superficie del material acomodándose a la estructura de la matriz en la dirección de los canales. También se observa una cierta penetración celular hacia el interior de los microcanales. Lamentablemente, la ausencia de un flujo continuo que garantice el suministro de nutrientes y oxígeno a las células internalizadas conduce a la muerte celular en profundidades superiores a varias decenas de micras.

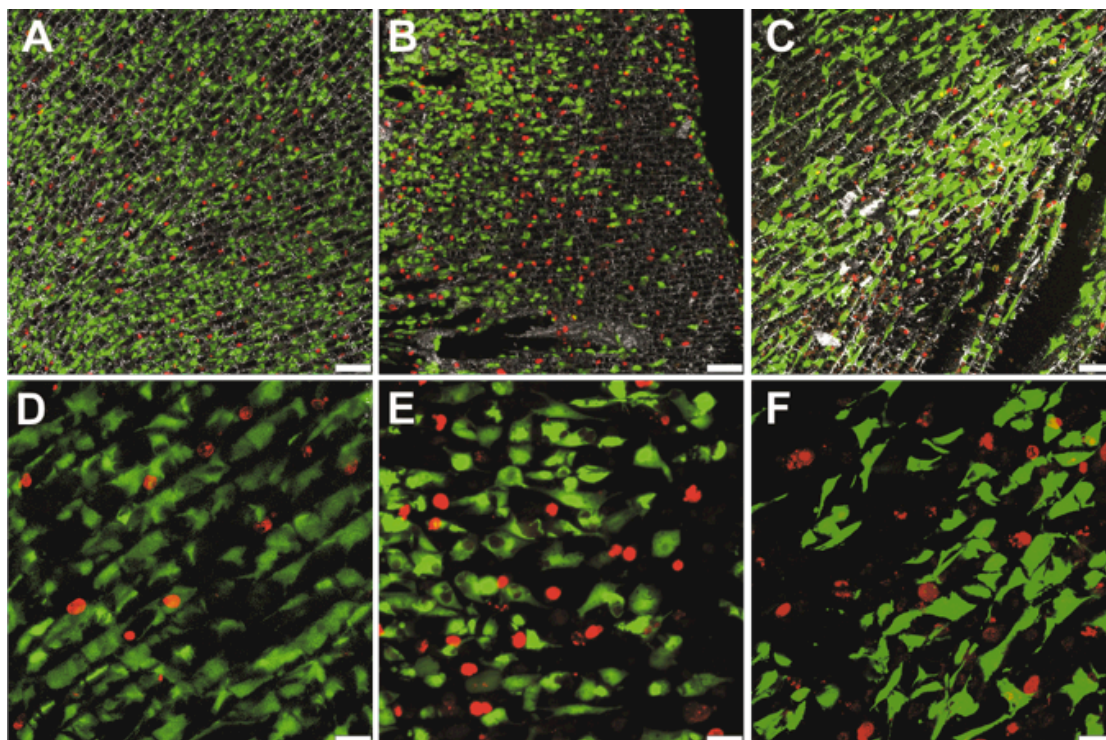


Figura 9.19. Estudios de viabilidad celular de cultivos de osteoblastos humanos Saos-2 sobre *scaffolds* NTC (A,D), NTCG (B,E) y NTCGM (C,F). Barras de escala: 75 µm (A-C) y 25 µm (D-F).

La cuantificación de estos resultados (ver apartado 3.2.2.6.7) revela una reducción significativa de la viabilidad celular en los cultivos sobre los *scaffolds* NTCG, en comparación con los *scaffolds* NTC ($77 \pm 5.9\%$ y $91 \pm 1.3\%$, respectivamente; $p = 0.000$) (Tabla 9.2). La explicación más plausible para esta disminución en la viabilidad celular puede ser la presencia de residuos tóxicos del glutaraldehído utilizado para el entrecruzamiento de los soportes NTCG. Es interesante destacar, no obstante, que este supuesto “efecto nocivo” del glutaraldehído desaparece en los *scaffolds* NTCGM, probablemente debido al recubrimiento con cristales DCPD, lo que induce la recuperación de la viabilidad de los cultivos hasta los niveles encontrados en los *scaffolds* NTC ($85 \pm 4.9\%$ y $91 \pm 1.3\%$, respectivamente; $p = 0.063$).

Tabla 9.2. Estudios de viabilidad celular de osteoblastos humanos Saos-2 cultivados sobre *scaffolds* NTC, NTCG y NTCGM. Significación estadística: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

TCP	NTC	NTCG	NTCGM	Estadística (valor p)	
				ANOVA	Scheffé
$100 \pm 0.1 \%$	$91 \pm 1.3 \%$	$77 \pm 5.9 \%$	$85 \pm 4.9 \%$	0.000	TCP-all 0.000***
				***	NTC-NTCG 0.000***
					NTCG-NTCGM 0.005**
					NTC-NTCGM 0.063

9.4.2. ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS

Una vez comprobada la biocompatibilidad de los *scaffolds* NTCGM, se estudia su capacidad para inducir la diferenciación terminal de osteoblastos humanos Saos-2 *in vitro* hacia osteocitos maduros, dado el papel crítico que este tipo celular desempeña en la regulación de los procesos de calcificación y maduración ósea.⁷⁴ Los osteocitos son osteoblastos terminales diferenciados que constituyen aproximadamente el 90% de las células presentes en la matriz ósea.⁷⁵ Estas células juegan un papel crítico en el control de la homeostasis mineral y la formación y resorción ósea,⁷⁶ mediante la producción y modulación de la secreción de hormonas y factores de crecimiento.⁷⁷ Durante la formación y maduración del hueso, la fosfatasa alcalina (ALP), principal enzima involucrada en los procesos de mineralización, puede ser utilizada como marcador funcional del grado de diferenciación y maduración de los osteoblastos.

En este trabajo de tesis, se evalúa la actividad de ALP en osteoblastos Saos-2 cultivados en *scaffolds* NTC, NTCG y NTCGM, así como en placas de cultivo estándar de poliestireno (TCP) usadas como superficie control adicional. En estos estudios, los cultivos de osteoblastos se incuban en medio estándar (DMEM) o en medio calcificante (ODMEM) ([ver apartado 3.2.3.4.2](#)), que contiene factores osteogénicos que promoverán positivamente la diferenciación osteoblástica. No obstante, es de esperar que cierto grado de diferenciación ocurra también en ausencia de factores osteogénicos (es decir, en DMEM) debido a la maduración natural del cultivo de osteoblastos en presencia de calcio (CaCl_2 , 1.80 mM) y de fosfatos inorgánicos (NaH_2PO_4 , 1.04 mM), ambos componentes de la formulación normal del medio DMEM. Por este motivo, la actividad ALP se expresa en ratios de actividad ODMEM/DMEM.

Los resultados obtenidos revelan que las células cultivadas en TCP experimentan un aumento significativo de la actividad de ALP on ODMEM, aumento que, por el contrario, es sólo residual en DMEM. La ratio de actividad de ALP en ODMEM frente a DMEM es de 1.19 a los 7 días (7.24 vs 6.10 unidades/mg proteína \cdot cm² para ODMEM y DMEM, respectivamente véase la [tabla 9.3](#)) y aumenta hasta 1.4 veces a los 14 días (1.68 unidades/mg de proteína \cdot cm²). Las ratios de actividad de ALP en los *scaffolds* NTC y NTCG a los 7 días son ligeramente inferiores a los encontrados sobre TCP (0.84 y 0.97, respectivamente), aunque también se incrementan después de 14 días (1.23 y 1.25, respectivamente) ([Fig. 9.20](#)). Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos valores no están normalizados por la superficie real de los *scaffolds*. En éstos, aún cuando la superficie de corrección utilizada es la base del cilindro (0.16 cm²), la superficie real en la que las células están creciendo es sólo una fracción de la misma,

debido a la presencia de microcanales en el soporte (Fig. 9.18 y Fig. 9.19). Así, el aumento relativo de la actividad ALP entre 7 y 14 días es casi equiparable al observado en TCP (ca. 1.4 veces).

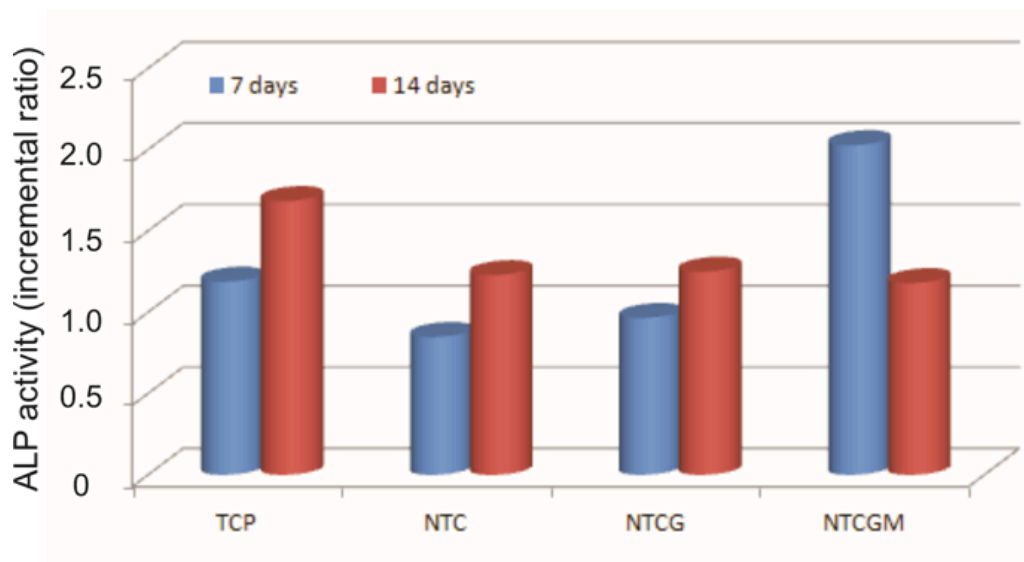


Figura 9.20. Aumento de la actividad de fosfatasa alcalina en cultivos de osteoblastos humanos Saos-2 sobre TCP y *scaffolds* NTC, NTCG y NTCGM (valores expresados como cociente de ALP en medio calcificante ODMEM respecto a DMEM).

Los datos más interesantes se observan, no obstante, para los *scaffolds* NTCGM. En este caso, la ratio de actividad de ALP a los 7 días es 2.03, muy por encima de la obtenida en cultivos sobre TCP (Fig. 9.20) y más del doble de la encontrada en *scaffolds* NTC y NTCG a los 7 días (0.84-0.97). A los 14 días, sin embargo, estas diferencias desaparecen (ca. 1.2 para todos los soportes). El notable aumento de la diferenciación de los osteoblastos en los *scaffolds* NTCGM en un tiempo de cultivo tan temprano como 7 días puede atribuirse a la presencia de cristales de DCPD. Apoyando estos resultados, estudios previos han demostrado que, en el proceso de regeneración ósea, la calcificación de los soportes impulsa la maduración terminal de los osteocitos.⁷⁸ Por ejemplo, la actividad de la ALP en células preosteoblásticas de ratón MCT3-E1, cultivadas en HAp electrodepositada sobre *scaffolds* de nanofibras de ácido poliláctico (PLLA) aumenta significativamente en presencia de factores osteogénicos.⁴³ Así mismo, se ha inducido diferenciación terminal en osteoblastos primarios humanos cultivados sobre un soporte bifásico 3D formado por partículas cerámicas de fosfatos de calcio (60% hidroxiapatita + 40% de fosfato tricálcico con diámetro de 40-80 μm), incluso en ausencia de factores osteogénicos.⁷⁹ Adicionalmente, las propiedades de adsorción de los nanotubos de

carbono (MWCNTs) pueden contribuir a promover la deposición de calcio y así aumentar la actividad de la ALP. En esta línea, por ejemplo, se ha demostrado que soportes de grafeno y MWCNTs recubiertos con polietilenglicol inducen la diferenciación osteoblástica de las células mesenquimales en presencia de factores osteogénicos, tales como el ácido ascórbico o el β -glicerol fosfato.⁸⁰⁻⁸¹ Finalmente, la disminución de la actividad de la ALP observada a los 14 días podría atribuirse a procesos relacionados con la formación de matriz extracelular y la maduración/envejecimiento natural de los cultivos de osteoblastos una vez alcanzada la confluencia.⁸² En este sentido, a medida que el cultivo evoluciona en el tiempo, el nivel de confluencia pasaría a adquirir un papel más relevante en el proceso de diferenciación celular que en las primeras etapas.

Tabla 9.3. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en cultivos de osteoblastos humanos Saos-2 sobre *scaffolds* NTC, NTCG y NTCGM. Se incluyen también los datos obtenidos sobre placas de TCP. Estadística: (a) *t-Student* DMEM vs. ODMEM para cada condición de cultivo y (b) análisis de varianza (ANOVA), con posterior aplicación de prueba *post hoc* de Scheffé o Games-Howell para cada condición de cultivo. En todas las evaluaciones, se considera estadísticamente significativo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

	Fosfatasa alcalina (ALP) (Unidades mg protein ⁻¹ cm ⁻²)		Estadística	Incremento
	DMEM	ODMEM		ODMEM/DMEM
7 días				
TCP	6.10 ± 0.94	7.24 ± 0.79	a 0.005**	1.19
NTC	0.82 ± 0.18	0.69 ± 0.05	a 0.037*	0.84
NTCG	0.93 ± 0.17	0.90 ± 0.07	a 0.567	0.97
NTCGM	0.71 ± 0.29	1.44 ± 0.38	a 0.000***	2.03
Estadística	b TCP***	b TCP***		
		b NTC-NTCG***		
		b NTCGM***		
14 días				
TCP	4.26 ± 0.47	7.17 ± 1.43	a 0.000***	1.68
NTC	0.34 ± 0.02	0.41 ± 0.07	a 0.002***	1.23
NTCG	0.56 ± 0.14	0.70 ± 0.07	a 0.006**	1.25
NTCGM	0.57 ± 0.12	0.67 ± 0.21	a 0.163	1.18
Estadística	b TCP***	b TCP***		
		b NTC***		

9.5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Numerosos estudios han demostrado ampliamente que la presencia de fosfato de calcio en biomateriales para Ingeniería de tejido óseo mejora su integración en el tejido nativo, además de facilitar la adecuada funcionalidad de las células que componen dicho tejido. Por este motivo, la mineralización de soportes se presenta como una alternativa prometedora para la funcionalización de biomateriales para Ingeniería de tejido óseo. Sin embargo, la aplicación de esta metodología en *scaffolds* tridimensionales (aquellos en los que la tercera dimensión se encuentra en la misma escala que las otras dos) no es en absoluto una cuestión trivial, debido a la dificultad para obtener una capa homogénea de mineral depositado en toda la superficie interna del soporte.

En estos estudios, se ha logrado la homogénea mineralización de *scaffolds* 3D compuestos de nanotubos de carbono y quitosano mediante la aplicación de un "flujo continuo" durante el proceso de electrodeposición. De este modo, y con independencia de las condiciones experimentales utilizadas para dicha electrodeposición (por ejemplo, tiempo, temperatura y voltaje), el aporte continuo de sales minerales a lo largo de toda la estructura es el factor principal que permite recubrir de modo homogéneo la estructura interna de todo el *scaffold* 3D. Por último, se ha demostrado que los soportes mineralizados resultantes no sólo muestran una biocompatibilidad notable con osteoblastos humanos, sino que también aceleran la maduración funcional de estas células (a partir de 7 días, en presencia de factores osteogénicos como el β -glicerol fosfato, la dexametasona o el ácido ascórbico).

En conclusión, estos *scaffolds* se pueden considerar materiales multifuncionales muy atractivos para el tratamiento y la regeneración del tejido óseo, dada su estructura jerárquica 3D, su biocompatibilidad y sus propiedades osteoconductoras.

9.6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ A. Praemer, S. Furner, D.P. Rice, "Musculoskeletal conditions in the United States" 2nd Ed., American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, v.III, (1999).
- ² N.E. Lane, "Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194 (2006) S3-S11.
- ³ P.V., Giannoudis, H. Dinopoulos, E. Tsiridis, "Bone substitutes: an update" *Injury* 36 (2005) S20-S27.
- ⁴ A.J. Salgado, O.P. Coutinho, R.L. Reis, "Bone tissue engineering: State of the art and future trends" *Macromolecular Bioscience* 4 (2004) 743-765.
- ⁵ G. Davenport, "Rheumatology and musculoskeletal medicine" *British Journal of General Practice* 54 (2004) 457-464.
- ⁶ D.W. Sommerfeldt, C.T. Rubin, "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton" *European Spine Journal* 10 (2001) S86-S95.
- ⁷ M. Vallet-Regi, J.M. González-Calbet, "Calcium phosphates as substitution of bone tissue" *Progress in Solid State Chemistry* 32 (2004) 1-31.
- ⁸ M.A. Meyers, P.Y. Chen, A. Y.-M. Lin, Y. Seki, "Biological materials: Structure and mechanical properties" *Progress in Materials Science* 53 (2008) 1-206.
- ⁹ S.J. Stupp, P.V. Braun, "Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors" *Science* 277 (1997) 1242-1248.
- ¹⁰ J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone" *Medical Engineering & Physics* 20 (1998) 92-102.
- ¹¹ F. Barthelat, "Biomimetics for next generation materials" *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 365 (2007) 2907-2919.
- ¹² B. Ben-Nissan, "Biomimetics and bioceramics" *NATO Science Series* 171 (2005) 89-103.
- ¹³ V. Karageorgiou, D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.
- ¹⁴ Y. Kubokyo, H. Takita, D. Kobayashi, E. Tsuruga, M. Inoue, M. Murata, N. Nagai, Y. Dohi, H. Ohgushi, "BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis" *Journal of Biomedical Materials Research* 39 (1998) 190-199.
- ¹⁵ M. Svehla, P. Morberg, B. Zicat, W. Bruce, D. Sonabend, W.R. Walsh, "Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures" *Journal of Biomedical Materials Research* 51 (2000) 15-22.
- ¹⁶ R.C. Thomson, M.C. Wake, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, "Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs" *Advances in Polymer Science* 122 (1995) 245-274.
- ¹⁷ H.-Y. Lee, G.-Z. Jin, U.S. Shin, J.-H. Kim, H.W. Kim, "Novel porous scaffolds of poly(lactic acid) produced by phase-separation using room temperature ionic liquid and the assessments of biocompatibility" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2012) 1-9.
- ¹⁸ A.G. Mikos, J.S. Temenoff, "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering" *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (2000) 1-6.
- ¹⁹ D.W. Hutmacher, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives" *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition* 12 (2001) 107-124.

- ²⁰ E. Sachlos, J.T. Czernuszka, “Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds” *European Cells and Materials* 5 (2003) 29-40.
- ²¹ H.W. Kim, J.H. Song, H.E. Kim, “Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration” *Advanced Functional Materials* 15 (2005) 1988–1994.
- ²² D.W. Green, I. Levenque, D. Walsh, D. Howard, X. yang, K. Partridge, S. Mann, R.O.C. Oreffo, “Biom mineralized polysaccharide capsules for encapsulation, organization, and delivery of human cell types and growth factors” *Advanced Functional Materials* 15 (2005) 917-923.
- ²³ J. Song, V. Malathong, C.R. Bertozzi, “Mineralization of synthetic polymer scaffolds: A bottom-up approach for the development of artificial bone” *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 3366-3372.
- ²⁴ F.C. Meldrum, H. Cölfen, “Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems” *Chemical Reviews* 108 (2008) 4332-4432.
- ²⁵ C. Rodríguez-Valencia, L. Rial, J. Serra, P. González, J.B. Rodríguez-González, C. Mateo-Mateo, M.A. Correa-Duarte, “Tuning the biomineralization process for controlling the nucleation and oriented growth of Ca-P crystals onto functionalized carbon nanotubes” *Journal of Physical Chemistry C* 116 (2012) 3400-3404.
- ²⁶ M. Antonietti, M. Breulmann, C.G. Göltner, H. Cölfen, K.K.W. Wong, D. Walsh, S. Mann, “Inorganic/organic mesostructures with complex architectures: Precipitation of calcium phosphate in the presence of double-hydrophilic block copolymers” *Chemistry - A European Journal* 4 (1998) 2493-2500.
- ²⁷ K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, “Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering” *Biomaterials* 27 (2006) 3413-3431.
- ²⁸ Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia, “Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives” *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 1245-1256.
- ²⁹ H. Qiu, J. Yang, P. Kodali, J. Koh, G.A. Ameer, “A citric acid-based hydroxyapatite composite for orthopedic implants” *Biomaterials* 27 (2006) 5845-5854.
- ³⁰ A.O. Lobo, M.A.F. Corat, S.C. Ramos, J.T. Matsushima, A.E.C. Granato, C. Pacheco-Soares, E.J. Corat, “Fast preparation of hydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube composites for bioactive application” *Langmuir* 26 (2010) 18308-18314.
- ³¹ N. Eliaz, S. Shmueli, I. Shur, D. Benayahu, D. Aronov, G. Rosenman, “The effect of surface treatment on the surface texture and contact angle of electrochemically deposited hydroxyapatite coating and on its interaction with bone-forming cells” *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 3178-3191.
- ³² J. Wang, Y. Chao, Q. Wan, Z. Zhu, H. Yu, “Fluoridated hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition” *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1798-1807.
- ³³ D. Richard, N. Dumelié, H. Benhayoune, S. Bouthors, C. Guillaume, N. Lalun, G. Balossier, D.J. Laurent-Maquin, “Behavior of human osteoblast-like cells in contact with electrodeposited calcium phosphate coating” *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 79 (2006) 108-115.
- ³⁴ M. Bohner, U. Gbureck, J.E. Barralet, “Technological issue for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment” *Biomaterials* 26 (2005) 6423-6429.
- ³⁵ S.A. Clarke, P. Walsh, C.A. Maggs, F. Buchanan, “Designs from the deep: Marine organisms for bone tissue engineering” *Biotechnology Advances* 29 (2011) 610-617.
- ³⁶ S.-S. Kim, M.S. Park, O. Jeon, C.Y. Choi, B.S. Kim, “Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering” *Biomaterials* 27 (2006) 1399-1409.

- ³⁷ M.J. Hortigüela, M.C. Gutiérrez, I. Aranaz, M. Jobbágy, A. Abarrategi, C. Moreno-Vicente, A. Civantos, V. Ramos, J.L. López-Lacomba, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Urea assisted hydroxyapatite mineralization on MWCNT/CHI scaffolds" *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008) 5933-5940.
- ³⁸ S. Shanbhag, S. Wang, N.A. Kotov, "Cell distribution profiles in three-dimensional scaffolds with inverted-colloidal-crystal geometry: Modeling and experimental investigations" *Small* 1 (2005) 1208-1214.
- ³⁹ E.D. Eanes, A.S. Posner, "A note on the crystal growth of hydroxyapatite precipitated from aqueous solutions" *Materials Research Bulletin* 5 (1970) 377-383.
- ⁴⁰ F.C.M. Driessens, R.M.H. Verbeek, "Metastable state in calcium phosphate - Aqueous phase equilibrations" *Journal of Crystal Growth* 53 (1981) 55-62.
- ⁴¹ R. Hu, C. Lin, H. Shi, H. Wang, "Electrochemical deposition mechanism of calcium phosphate coating in dilute Ca-P electrolyte system" *Materials Chemistry and Physics* 115 (2009) 718-723.
- ⁴² A. Rakngarm, Y. Mutoh, "Electrochemical depositions of calcium phosphate film on commercial pure titanium and Ti-6Al-4V in two types of electrolyte at room temperature" *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 275-283.
- ⁴³ C. He, G. Xiao, X. Jin, C. Sun, P.X. Ma, "Electrodeposition on nanofibrous polymer scaffolds: Rapid mineralization, tunable calcium phosphate composition and topography" *Advanced Functional Materials* 20 (2010) 3568-3576.
- ⁴⁴ A. Vertova, R. Barhdadi, C. Cachet-Vivier, C. Locatelli, A. Minguzzi, J.-Y. Nedelec, S. Rondinini, "Cavity microelectrodes for the voltammetric investigation of electrocatalysts: The electroreduction of volatile halides on micro-sized silver powders" *Journal of Applied Electrochemistry* 38 (2008) 965-971.
- ⁴⁵ C. Wu, Z. Wen, C. Dai, Y. Lu, F. Yang, "Fabrication of calcium phosphate/chitosan coatings on AZ91D magnesium alloy with a novel method" *Surface and Coating Technology* 204 (2010) 3336-3347.
- ⁴⁶ X. Cheng, M. Filiaggi, S.G. Roscoe, "Electrochemically assisted co-precipitation of protein with calcium phosphate coatings on titanium alloy" *Biomaterials* 25 (2004) 5395-5403.
- ⁴⁷ R. Ma, K.N. Sask, C. Shi, J.L. Brash, I. Zhitomirsky, "Electrodeposition of polypyrrole-heparin and polypyrrole-hydroxyapatite films" *Materials Letters* 65 (2011) 681-684.
- ⁴⁸ C. He, F. Zhang, L. Cao, W. Feng, K. Qiu, Y. Zhang, H. Wang, X. Mo, J. Wang, "Rapid mineralization of porous gelatin scaffolds by electrodeposition for bone tissue engineering" *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 2111-2119.
- ⁴⁹ A. Naldoni, A. Minguzzi, A. Vertova, V. Dal Santo, L. Borgese, C.L. Bianchi, "Electrochemically assisted deposition on TiO₂ scaffold for tissue engineering: an apatite bio-inspired crystallization pathway" *Journal of Materials Chemistry* 21 (2011) 400-407.
- ⁵⁰ N. Halonen, A. Rautio, A.-R. Leino, T. Kyllönen, G. Tóth, J. Lappalainen, K. Kordás, M. Huuhtanen, R.L. Keiski, A. Sági, M. Szabó, A. Kukovecz, Z. Kónya, I. Kricsi, P.M. Ajayan, R. Vajtai, "Three-dimensional carbon nanotube scaffolds as particulate filters and catalyst support membranes" *ACS Nano* 4 (2010) 2003-2008.
- ⁵¹ J. Zou, J. Liu, A.S. Karakoti, A. Kumar, D. Joung, Q. Li, S.I. Khondaker, S. Seal, L. Zhai, "Ultralight multiwalled carbon nanotube aerogel" *ACS Nano* 4 (2010) 7293-7302.
- ⁵² J.G. Duque, C.E. Hamilton, G. Gupta, S.A. Crooker, J.J. Crochet, A. Mohite, H. Htoon, K.A.D. Obrey, A.M. Dattelbaum, S.K. Doorn, "Fluorescent single-walled carbon aerogels in surfactant-free environments" *ACS Nano* 5 (2011) 6686-6694.
- ⁵³ C. Lau, M.J. Cooney, "Conductive macroporous composite chitosan-carbon nanotube scaffolds" *Langmuir* 24 (2008) 7004-7010.

- ⁵⁴ M.C. Gutiérrez, M.J. Hortigüela, J.M. Amarilla, R. Jiménez, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Macroporous 3D architectures of self-assembled MWCNT surface decorated with pt nanoparticles as anodes for a direct methanol fuel cell" *Journal of Physical Chemistry C* 111 (2007) 5557-5560.
- ⁵⁵ A. Abarrategi, M.C. Gutiérrez, C. Moreno-Vicente, M.J. Hortigüela, V. Ramos, J.L. López-Lacomba, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes" *Biomaterials* 29 (2008) 94-102.
- ⁵⁶ M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Ice-templated materials: sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly" *Chemistry of Materials* 20 (2008) 634-648.
- ⁵⁷ M.C. Gutiérrez, Z.Y. Garcia-Carvajal, M.J. Hortigüela, J. Yuste, F. Rojo, M.L. Ferrer, F. del Monte, "Biocompatible MWCNT scaffolds for immobilization and proliferation of E. coli" *Journal of Materials Chemistry* 17 (2007) 2992-2995.
- ⁵⁸ S.R. Mukai, H. Nishihara, H. Tamon, "Formation of monolithic silica gel microhoneycombs (SMHs) using pseudosteady state growth of microstructural ice crystals" *Chemical Communications* 10 (2004) 874-875.
- ⁵⁹ H. Zhang, I. Hussain, M. Brust, M.F. Butler, S.P. Rannard, A.I. Cooper, "Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles" *Nature Materials* 4 (2005) 787-793.
- ⁶⁰ X. Wu, L. Black, G. Santacana-Laffitte, C.W. Patrick Jr., "Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 81 (2007) 59-65.
- ⁶¹ C.-K. Peng, S.-H. Yu, F.L. Mi, S.-S. Shyu, "Polysaccharide-based artificial extracellular matrix: Preparation and characterization of three-dimensional, macroporous chitosan and chondroitin sulfate composite scaffolds" *Journal of Applied Polymer Science* 99 (2006) 2091-2100.
- ⁶² E.F.S. Vieira, A.R. Cestari, C. Airoidi, W. Loh, "Polysaccharide-based hydrogels: preparation, characterization, and drug interaction behaviour" *Biomacromolecules* 9 (2008) 1195-1199.
- ⁶³ F. Chen, M. Tian, D. Zhang, J. Wang, Q. Wang, X. Yu, X. Zhang, C. Wan, "Preparation and characterization of oxidized alginate covalently cross-linked galactosylated chitosan scaffold for liver tissue engineering" *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 310-320.
- ⁶⁴ F.A.A. Tirkistani, "Thermal analysis of some chitosan Schiff bases" *Polymer Degradation and Stability* 60 (1998) 67-70.
- ⁶⁵ D.Y. Lewitus, J. Landers, J.R. Branch, K.L. Smith, G. Callegari, J. Koh, A.V. Neimark, "Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering" *Advanced Functional Materials* 21 (2011) 2624-2632.
- ⁶⁶ K. Katuri, m.L. Ferrer, M.C. Gutiérrez, R. Jiménez, F. Del Monte, D. Leech, "Three-dimensional microchannelled electrodes in flow-through configuration for bioanode formation and current generation" *Energy and Environmental Science* 4 (2011) 4201-4210.
- ⁶⁷ M. Shirkhanzadeh, "Bioactive calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition" *Journal of Materials Science Letters* 10 (1991) 1415-1417.
- ⁶⁸ T. Miyata, T. Masuko, "Morphology of poly(L-lactide) solution-grown crystals" *Polymer* 38 (1997) 4003-4009.
- ⁶⁹ A. Bigi, E. Boanini, D. Walsh, S. Mann, "Morphosynthesis of octacalcium phosphate hollow microspheres by polyelectrolyte-mediated crystallization" *Angewandte Chemie International Edition* 41 (2002) 2163-2166.
- ⁷⁰ Y.-H. Tseng, C.-Y. Mou, J.C.C. Chan, "Solid-state NMR study of the transformation of octacalcium phosphate to hydroxyapatite: a mechanistic model for central dark line formation" *Journal of American Chemical Society* 128 (2006) 6909-6918.

- ⁷¹ M. Shirkhazadeh, "Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9 (1998) 67-72.
- ⁷² M.Alcaide, M.-C. Serrano, J. Roman, M.-V. Cabañas, J. Peña, E. Sánchez-Zapardiel, M. Vallet-Regí, M.-T. Portolés, "Suppression of anoikis by collagen coating of interconnected macroporous nanometric carbonated hydroxyapatite/agarose scaffolds" *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 95 (2010) 793-800.
- ⁷³ D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility" *Biomaterials* 29 (2008) 2941-2953.
- ⁷⁴ S.L. Dallas, P.A. Veno, J.L. Rosser, C. Barragan-Adjemian, D.W. Rowe, I. Kalajzic, L.F. Bonewald, "Time lapse imaging techniques for comparison of mineralization dynamics in primary murine osteoblasts and late osteoblast/early osteocyte-like cell line MLO-A5" *Cells Tissues Organs* 189 (2008) 6-11.
- ⁷⁵ D. Zhu, N.C.W. Mackenzie, J.L. Millan, C. Farquharson, V.E. MacRae, "The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells" *PLoS One* 6 (2011) e19595.
- ⁷⁶ E.H. Burger, J. Klein-Nulen, "Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro" *Advances in Dental Research* 13 (1999) 93-98.
- ⁷⁷ L.F. Bonewald, "Osteocytes as dynamic multifunctional cells" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116 (2007) 281-290.
- ⁷⁸ K. Irie, S. Ejiri, Y. Sakakura, T. Shibui, T.J. Yajima, "Matrix mineralization as a trigger for osteocyte maturation" *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56 (2008) 561-567.
- ⁷⁹ F. Boukhechba, T. Balaguer, J.-F. Michiels, K. Ackermann, D. Quincey, J.-M. Boulter, W. Pyerin, G.F. Carle, N. Rochet, "Human primart osteocyte differentiation in a 3D culture system" *Journal of Bone Mineral Research* 24 (2009) 1927-1935.
- ⁸⁰ T.R. Nayak, L. Jian, L.C. Phua, H.K. Ho, Y. Ren, G. Pastorin, "Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation" *ACS Nano* 4 (2010) 7717-7725.
- ⁸¹ T.R. Nayak, H. Andersen, V.S. Makam, C. Khaw, S. Bae, X. Xu, P.-L.R. Ee, J.-H. Ahn, B.H. Hong, G. Pastorin, B. Özyilmaz, "Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells" *ACS Nano* 5 (2011) 4670-4678.
- ⁸² H. Siggelkow, K. Benzler, M.J. Atkinson, M. Hübner, "The use of confluence stages does not decrease the overall variability in primary human osteoblasts but can give additional information on differentiation in vitro" *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 106 (1998) 217-225.

X. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

1.- Los soportes porosos tridimensionales (*scaffolds*) preparados, en este trabajo, mediante un proceso criogénico biocompatible, denominado ISISA, han demostrado su utilidad como biomateriales en procesos de liberación controlada de componentes biológicamente activos (antibióticos o factores de crecimiento), así como su biocompatibilidad en diversos procesos *in vitro* e *in vivo*.

2.- Los *scaffolds* multifuncionales, preparados aplicando la metodología ISISA sobre de hidrogeles de quitosano, que contienen fosfato de calcio amorfo (ACP) y un fármaco (ciprofloxacino, CFX) podrían favorecer, simultáneamente, la regeneración de tejido óseo (gracias a la presencia de ACP) y evitar infecciones después de su implantación quirúrgica, ya que se observa la liberación controlada del fármaco de estos soportes. El estudio comparativo de co-precipitación de ACP y CFX en hidrogeles de quitosano y en disolución acuosa ha permitido establecer las condiciones óptimas para su síntesis.

3.- Los estudios *in vitro* con células C2C12 realizados sobre *scaffolds* de quitosano, con distintos pesos moleculares, en los que se ha incorporado la proteína morfogenética ósea rhBMP-2 han demostrado que la liberación controlada de la proteína es capaz de favorecer su proliferación y diferenciación hacia tejido óseo. Además, estos ensayos de liberación de rhBMP-2 indican que el proceso de difusión es inicialmente muy rápido, aunque parte de la proteína queda atrapada en el soporte. Los estudios *in vivo* muestran que la liberación de la proteína favorece la formación de tejido y la degradación del soporte, con respecto a los mismos soportes sin proteína.

4.- La metodología ISISA permite construir *scaffolds* de sulfato de condroitina y nanotubos de carbono (MWCNTs o NHTS) con una estructura porosa en forma de microcanales alienados, cuya morfología y propiedades pueden ser modificadas ejerciendo un control sobre las variables que afectan al proceso (como son la velocidad de congelado, la concentración y el tamaño del soluto). Los *scaffolds* obtenidos presentan buenas propiedades mecánicas y de conductividad, que pueden ser moduladas variando las condiciones de síntesis, como el aumento de la concentración del polímero usado como agente dispersante o la concentración de

nanotubos. La utilización de los nanotubos cortos (NHTS) influye notablemente en las propiedades del soporte, principalmente, en su conductividad.

5.- Los cultivos *in vitro* realizados con diferentes tipos celulares (fibroblastos L929, osteoblastos Saos-2 y células endoteliales EC_{PC}) sobre *scaffolds* con nanotubos de carbono (MWCNTs y NHTS) y diferentes polímeros como agentes dispersantes (quitosano, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, gelatina y elastina) han permitido realizar una evaluación, a nivel celular, de la reactividad de los distintos soportes 3D con estos sistemas biológicos, evidenciando una adecuada biocompatibilidad para la mayoría de estos materiales.

6.- La variación de la temperatura de congelación en el proceso ISISA permite controlar la porosidad del material resultante. En particular, la disminución de la temperatura favorece la formación de poros de mayor tamaño en *scaffolds* de quitosano y sulfato de condroitina. Se ha logrado, así, el objetivo de conseguir *scaffolds* con un tamaño de poro lo bastante grande como para permitir una colonización celular homogénea. Los experimentos preliminares en flujo muestran que los soportes 3D preparados pueden ser excelentes candidatos para permitir esta completa colonización, a lo largo de todo el material.

7.- La aplicación de un “flujo continuo” a través de un *scaffold*, compuesto por quitosano y MWCNTs, durante un proceso de electrodeposición ha permitido realizar la mineralización homogénea con fosfato de calcio de la estructura interna del soporte 3D. Se ha demostrado la validez del proceso de mineralización en diferentes condiciones experimentales de temperatura, tiempo, voltaje, y concentración inicial de sales. Estudios con células de osteoblastos humanos (Saos-2) demuestran la extraordinaria biocompatibilidad de los soportes 3D mineralizados e indican que la presencia inicial de DCPD en estos materiales favorece una rápida diferenciación a osteoblastos más maduros. Estos *scaffolds* podrían considerarse atractivos como materiales multifuncionales para la cicatrización y regeneración ósea gracias a la combinación de una estructura jerárquica en 3D, y propiedades de biocompatibilidad y osteoconducción.

